

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA



**INMOVILIZACIÓN COVALENTE Y ORIENTADA DE
ENZIMA LACASA SOBRE DISTINTAS
SUPERFICIES PARA SU USO COMO CÁTODO EN
PILAS DE COMBUSTIBLE**

TESIS DOCTORAL DE
CRISTINA VAZ DOMÍNGUEZ



INSTITUTO DE CATÁLISIS Y PETROLEOQUÍMICA
(CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA

**INMOVILIZACIÓN COVALENTE Y ORIENTADA DE
ENZIMA LACASA SOBRE DISTINTAS
SUPERFICIES PARA SU USO COMO CÁTODO EN
PILAS DE COMBUSTIBLE**

Memoria que presenta la licenciada

CRISTINA VAZ DOMÍNGUEZ

para optar al grado de doctor

en Ciencias Químicas

DIRECTOR:

Profesor Víctor Manuel Fernández López

Instituto de Catálisis y Petroleoquímica

C.S.I.C. Madrid

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar al Profesor Víctor M. Fernández por hacer posible este trabajo de investigación al acogerme en su grupo de investigación. Así mismo quiero agradecerle la dirección y orientación de la presente tesis y los continuos ánimos para seguir adelante.

Agradecer también a Antonio L. de Lacey por todos los consejos, sugerencias, propuestas y discusiones científicas que tanto me han ayudado para sacar adelante esta Tesis Doctoral.

Agradecer al programa FPU del Ministerio de Educación y Ciencias por la financiación económica para la realización de la presente Tesis Doctoral y las estancias en el extranjero.

Al Profesor Cannistraro y a Laura Endolfi agradecerles la aceptación, supervisión y orientación durante mi estancia en la Universidad de Viterbo (Italia).

Al Doctor Sergey Shleev agradecerle la grata acogida en la Universidad de Lund (Suecia), así como su supervisión y orientación en los diversos trabajos realizados allí, que tanto han aportado a este trabajo.

Agradezco a Concepción Alonso la tutela realizada desde la Universidad Autónoma de Madrid. Y a los investigadores y demás personal del ICP (CSIC) por la colaboración aportada durante mi investigación.

Quisiera dar las gracias también a todos los compañeros de laboratorio con los que he compartido el día a día durante estos años: Jose María Abad, Alejandro Pardo, Marcos Pita, Alejandro Ballesteros, Asunción Alonso, Olaf Rüdiger, Moustafa Malki, Cristina Gutierrez, y especialmente a Susana Campuzano, por su gran pasión y ánimos contagiosos que incitan a seguir adelante. Igualmente, a todos los compañeros de ICP: Miren, Nieves, Ana, Lucía, Pamela, Manolo, Miguel, Kilo, Antonio.

También agradecer a todos mis amigos por los buenos ratos que pasamos y hacen más llevadero cualquier proyecto: compañeros de la carrera (Irene, Iria, Jorge, Víctor, Julio, Julito, David); de baile (Paloma y Jesús, Nuria y Alberto, Teresa y Jorge, Sergio y Sonia, Álvaro, Ana, Luis, Aida y Víctor, Diana y Sergio); y vecinos (Abel y Silvia, Marco y Verónica, Herminio y Vanesa).

Y por último, agradecer de corazón a mi familia por su esfuerzo, apoyo y amor incondicional sin lo que nada de esto hubiera sido posible: mis padres, Felisa y Teodoro, mi hermana Isabel, y mi novio Juanra.

ÍNDICE

1-. INTRODUCCIÓN	1
<i>1.1. Biopilas de combustible</i>	3
<i>1.2. Inmovilización de enzimas en superficies</i>	6
<i>1.3. Funcionalización de superficies</i>	9
1.3.1. Superficies metálicas	9
1.3.2. Superficies de carbón	11
<i>1.4. Lacasas</i>	13
1.4.1. Características generales	14
1.4.2. Estructura	14
1.4.3. Centros de cobre	16
1.4.4. Potencial redox del centro T1	17
1.4.5. Propiedades catalíticas	18
1.4.6. Sustratos	20
1.4.7. Inhibidores	21
1.4.8. Transferencia electrónica lacasa-electrodo	22
1.4.9. ABTS como mediador	23
1.4.10. Trametes hirsuta	24
<i>1.5. Cinética enzimática</i>	25

2-. OBJETIVOS	29
3-. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. <i>Materiales</i>	35
3.1.1. Enzima lacasa	35
3.1.2. Reactivos	35
3.1.3. Disoluciones	36
3.1.4. Instrumentación analítica	37
3.1.5. Material electroquímico	38
3.1.5.1. Electroodos	38
3.1.5.1. Celdas electroquímicas	39
3.1.6. Otros aparatos	39
3.2. <i>Métodos</i>	39
3.2.1. Caracterización de las enzimas	39
3.2.1.1. Medida de la concentración de enzima	39
3.2.1.2. Medida de la actividad enzimática	40
3.2.1.3. Cálculo de las constantes cinéticas	41
3.2.2. Pretratamiento de los electrodos	42
3.2.3. Caracterización electroquímica de los electrodos base	42
3.2.3.1. Área electroquímica	43
3.2.3.2. Área microscópica	43

3.2.4. Distribución del tamaño de poro	45
3.2.5. Funcionalización de los electrodos de oro	46
3.2.6. Funcionalización de los electrodos de carbono	47
3.2.6.1. Monocapa aminofenilos	47
3.2.6.2. Monocapa aminofenoles	47
3.2.7. Inmovilización de enzima lacasa en el electrodo	48
3.2.7.1. Adsorción física	48
3.2.7.2. Inmovilización covalente	48
3.2.8. Medidas electroquímicas	49
3.2.8.1. Electrodos funcionalizados con lacasa	49
3.2.8.2. Biopila de combustible	50
3.2.9. Detección de agua oxigenada	51
 4-. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 53
4.1. <i>Caracterización de la lacasa Trametes hirsuta</i>	55
4.1.1. Cálculo de la concentración de enzima	55
4.1.2. Cálculo de la actividad enzimática	56
4.1.3. Cálculo de las constantes cinéticas respecto al O ₂	57
4.2. <i>Electrodos de carbono</i>	62
4.2.1. Caracterización de los electrodos base	62

4.2.1.1. Caracterización electroquímica	62
4.2.1.2. Distribución porosa	63
4.2.2. Funcionalización de los electrodos de carbono	66
4.2.2.1. Recubrimiento de las superficies con una monocapa de 4-aminofenilos	66
4.2.2.1.1. <i>Formación de la monocapa</i>	66
4.2.2.1.2. <i>Características de la monocapa de aminofenilos covalentemente unida a las distintas superficies de carbono</i>	68
4.2.2.2. Recubrimiento de las superficies con una monocapa de <i>orto</i> -aminofenoles	69
4.2.2.2.1. <i>Formación de la monocapa</i>	69
4.2.2.2.2. <i>Optimización de la formación</i>	72
4.2.2.2.3. <i>Características de la monocapa de aminofenoles covalentemente unida a las distintas superficies de carbono</i>	76
4.2.3. Medida de la actividad electrocatalítica del enzima <i>Trametes hirsuta</i>	79
4.2.3.1. <i>Efecto del pH</i>	79
4.2.3.2. <i>Efecto de la temperatura</i>	82
4.2.3.3. <i>Efecto del potencial redox</i>	83

4.2.4. Optimización de las condiciones de inmovilización de la lacasa mediante enlace amida sobre electrodos de carbono funcionalizados	84
4.2.4.1. Unión covalente a electrodos modificados con una monocapa de aminofenilos/hidroxilaminos	85
<i>4.2.4.1.1. Efecto de la fuerza iónica</i>	85
<i>4.2.4.1.2. Efecto de la cantidad de enzima</i>	86
<i>4.2.4.1.3. Efecto del pH</i>	87
<i>4.2.4.1.4. Estudio simultáneo de la influencia del pH y la cantidad de enzima durante la inmovilización mediante metodología del diseño de experimentos</i>	89
4.2.4.2. Unión covalente a electrodos modificados con una monocapa de aminofenoles	93
<i>4.2.4.2.1. Estudio simultáneo de la influencia del pH y la cantidad de enzima durante la inmovilización mediante metodología del diseño de experimentos</i>	93
4.2.5. Propiedades electrocatalíticas de la lacasa de <i>Trametes hirsuta</i> inmovilizada covalentemente en electrodos de carbono mediante enlace amida	96
4.2.5.1. Experimentos control	96
4.2.5.2. Reducción electroenzimática de O₂ con diferentes superficies electródicas	97
4.2.5.3. Orientación de la lacasa en el electrodo	100
4.2.5.4. Sensibilidad	103

4.2.5.5. Estabilidad	104
4.2.5.6. Inhibición por haluros	106
4.2.5.6.1. <i>Fluoruros</i>	106
4.2.5.6.2. <i>Cloruros</i>	107
4.2.5.7. Efecto de la velocidad de rotación del electrodo	110
4.2.6. Inmovilización de la lacasa <i>Trametes hirsuta</i> a través de sus residuos azúcares superficiales (formación de bases de Schiff)	114
4.2.6.1. Efecto en la actividad enzimática en disolución	114
4.2.6.2. Respuesta electrocatalítica	115
4.2.6.3. Orientación de la lacasa	115
4.2.6.4. Efecto de la rotación	117
4.2.6.5. Inhibición por haluros	120
4.2.6.6. Estabilidad de la señal	120
4.3. <i>Electrodos de oro</i>	123
4.3.1. Electrodos tridimensionales	124
4.3.1.1. Caracterización de los electrodos	124
4.3.1.2. Respuesta electrocatalítica	127
4.3.1.3. Estabilidad	129
4.3.2. Electrodos de disco de oro	130
4.3.3. Nanopartículas de oro	132

4.4. <i>Diseño de una biopila de combustible enzimática basada en la transferencia electrónica directa entre enzima y electrodo</i>	136
4.4.1. Bioánodo enzimático	136
4.4.2. Biocátodo enzimático	138
4.4.3. Biopila de combustible	139
 5-. CONCLUSIONES	143
5.1. <i>Caracterización de la enzima</i>	145
5.2. <i>Electrodos de carbono</i>	145
5.3. <i>Electrodos de oro</i>	148
5.4. <i>Biopila de combustible</i>	148
 6-. BIBLIOGRAFÍA	151

1 - INTRODUCCIÓN

1.1. Biopilas de combustible

Las pilas de combustible son unos dispositivos capaces de obtener directamente energía eléctrica a partir de compuestos químicos. La gran ventaja que ofrecen frente a las pilas y baterías convencionales es que los electrodos son catalíticos por lo que, teóricamente, mientras que se repongan los combustibles el tiempo de producción de electricidad es ilimitado.

Las pilas de combustible convencionales datan de la década de 1840 y se basan en la oxidación de hidrógeno en el ánodo y la reducción de oxígeno en el cátodo usando catalizadores inorgánicos como el platino. A partir de 1980 se empezaron a desarrollar también pilas de combustible biológicas, o biopilas de combustible (BFC), que emplean enzimas o bacterias como electrocatalizadores. La gran ventaja de las biopilas es que no requieren las altas temperaturas de funcionamiento de las pilas de combustible convencionales (aunque teóricamente pueden trabajar a altas temperaturas usando organismos extremófilos), que el número de sustancias que pueden usarse como combustible es mucho mayor que en el caso de las pilas de combustible convencionales, que los biocatalizadores no suelen pasivarse por impurezas de los combustibles, y que no requieren Pt, metal escaso y caro, como electrocatalizador ²².

Por otra parte, la baja potencia, el menor voltaje de celda y la menor estabilidad de las biopilas frente a las pilas de combustible convencionales dificultó su aplicación en un primer momento. Actualmente las biopilas de combustible tienen gran interés para el desarrollo de biopilas minituarizadas que puedan implantarse en organismos vivos, incluso en el cuerpo humano, puesto que se cree que este tipo de pilas no serán tóxicas y funcionarán en disoluciones fisiológicas, usando como combustible sustratos presentes en el torrente sanguíneo, como pueden ser glucosa y oxígeno^{13, 22, 29, 45}.

El esquema general de una pila de combustible (figura 1.1.a) consta de dos electrodos, un cátodo, dónde se produce la reacción de reducción del comburente, y un ánodo, dónde tiene lugar la oxidación del combustible, unidos a través de un hilo conductor que permite el paso de electrones desde el ánodo hasta el cátodo. Para completar el circuito y que la pila pueda funcionar correctamente es preciso que se compensen las cargas generadas mediante el transporte de protones desde el compartimento anódico al catódico. Cuando el cátodo y el ánodo se encuentran en un mismo compartimento no se generan problemas para la compensación de cargas. Sin embargo, eso requiere que ambos electrodos funcionen bajo las mismas condiciones sin

que se produzcan reacciones cruzadas. La colocación de una membrana intercambiadora de protones entre el cátodo y el ánodo permite usar disoluciones diferentes para cada electrodo y permite el paso de protones que compensen las cargas generadas.

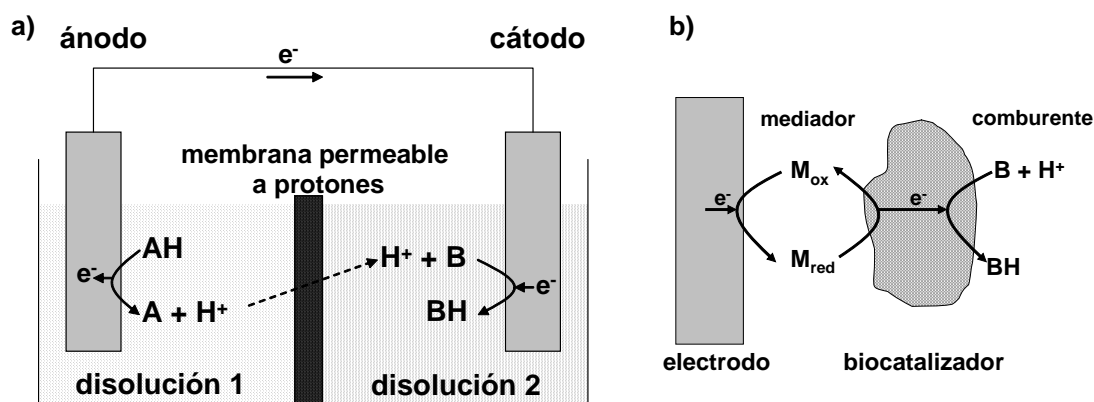


Figura 1.1. a) Esquema general de una pila de combustible en fase líquida. **b)** Estructura general de un cátodo biológico.

En el caso de las biopilas de combustible un sistema biológico es el responsable de la catálisis, siendo precisa la transferencia electrónica entre el biocatalizador y el electrodo, que generalmente se produce a través de mediadores (figura 1.1.b). Dos limitaciones importantes de las biopilas de combustible frente a las convencionales, basadas en electrocatalizadores de Pt, son la corta estabilidad operacional del sistema biológico y las bajas densidades de corriente medidas. El uso de biocatalizadores inmovilizados en el electrodo, en lugar de en disolución, mejora tanto la estabilidad del enzima como la transferencia electrónica con el electrodo, siendo posible incluso obtener corrientes catalíticas sin necesidad de mediadores (transferencia directa con el electrodo)⁶⁹.

Actualmente se están desarrollando dos tipos de biopilas de combustible que se diferencian en el biocatalizador usado: enzimas o microorganismos. Los microbios pueden catalizar la oxidación/reducción de mayor número de sustancias y su tiempo de vida suele ser mayor, pero la transferencia electrónica con el electrodo es más compleja y menos eficiente en comparación con las enzimas. Las enzimas, por su parte, presentan una alta velocidad catalítica y, en algunos casos, es posible la transferencia directa de los electrones con el electrodo, eliminando así el uso de mediadores y optimizando la transferencia electrónica. Además, los avances en el campo de inmovilización de enzimas en electrodos han permitido aumentar la vida media de las mismas.

El combustible más usado en el desarrollo de pilas de combustible es el hidrógeno que se oxida para producir agua, siendo por tanto un proceso limpio desde el punto de vista medio ambiental. En las pilas convencionales el electrocatalizador es platino, un metal caro y escaso. En las biopilas la oxidación de H_2 puede realizarse usando la enzima hidrogenasa inmovilizada en electrodos de carbono, pudiendo obtener unos resultados comparables a los de platino⁴⁹. Sin embargo, la mayor tendencia en las pilas de combustible biológicas es el uso de moléculas combustibles presentes en disoluciones fisiológicas, como la glucosa, que pueden ser reducidas enzimáticamente a CO_2 , obteniendo así la máxima energía posible de ellas²⁹.

Por otra parte, el comburente usado por excelencia en las pilas de combustible es el oxígeno, debido a su alta capacidad oxidativa y gran abundancia en el medio. Existe un amplio número de enzimas capaces de reducir oxígeno, puesto que es un elemento presente en gran cantidad de procesos biológicos, aunque en la mayoría de los casos la reducción se lleva a cabo a través de un sistema de cofactores, por lo que su uso como biocátodos no será muy factible. El diseño más simple para un biocátodo es aquel en que los electrones pasan directamente del electrodo a la enzima y luego al oxígeno (transferencia electrónica directa)¹³. También es necesario tener en cuenta el potencial al que se producirá la reducción, siendo deseable un potencial lo más positivo posible para optimizar el voltaje obtenido en la pila de combustible. Debido a sus características hay dos enzimas que están cobrando gran importancia en el desarrollo de biocátodos enzimáticos: la bilirrubina oxidasa y la lacasa. Se ha demostrado que ambas enzimas son capaces de reducir directamente el oxígeno a agua a un potencial cercano a los 800 mV vs. ENH cuando son adsorbidas en electrodos de carbono⁸⁷. Para que la reducción de O_2 tenga lugar de forma directa (sin la presencia de mediadores en el medio) es preciso que las enzimas se encuentren orientadas con el centro activo hacia el electrodo. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la orientación de la enzima en la superficie se produce al azar, por lo que no todas las enzimas inmovilizadas contribuyen a la catálisis directa. Por lo tanto, la optimización de la orientación de las enzimas en la superficie aumentará considerablemente la intensidad de corriente directa.

En los últimos años se han diseñado gran cantidad de biopilas de combustible enzimáticas, como puede verse en los trabajos de Bullen y cols.²² y de Davis y Higson²⁹. En dichos trabajos puede apreciarse, además, que las investigaciones se dirigen al desarrollo de biopilas de combustible capaces de trabajar en condiciones fisiológicas y basadas en la catálisis directa (sin la presencia de mediadores).

1.2. Inmovilización de enzimas en superficies

La definición de enzimas inmovilizadas se empezó a establecer en 1971 en la primera conferencia de ingeniería enzimática. Según dicha definición, enzimas inmovilizadas son enzimas físicamente confinadas o localizadas en una región del espacio reteniendo su actividad catalítica y pudiendo ser usadas continua y repetidamente¹⁶. Posteriormente se amplió el concepto considerando que la inmovilización de enzimas es un proceso en el cual se restringen los grados de libertad de movimiento de enzimas mediante su unión a un soporte, dando lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica⁸.

La inmovilización de enzimas se puede llevar a cabo sobre electrodos desnudos o previamente funcionalizados. La ventaja de trabajar con electrodos desnudos es que no es preciso ningún paso previo a la modificación con enzima, con el consecuente ahorro de tiempo y reactivos. Sin embargo hay que tener en cuenta que sobre superficies metálicas las enzimas suelen desnaturalizarse, perdiendo por tanto su capacidad enzimática. El uso de superficies funcionalizadas con monocapas no sólo previene la desnaturalización del enzima en la superficie, si no que, además, hace posible controlar la orientación de la enzima a través de los grupos funcionales expuestos y enlazar covalentemente la enzima al electrodo.

No existe un método ni un soporte ideal para la inmovilización de enzimas, por lo que es preciso seleccionar los adecuados en función de las características específicas que necesitemos. Por lo general, hay que tener en cuenta dos factores a la hora de elegir el método de inmovilización. El primero es que el proceso de inmovilización puede variar la estructura de la proteína, dando lugar a pérdidas de actividad o incluso a la inactivación completa de la enzima. El segundo factor a considerar es la orientación de los centros activos del enzima con respecto a la superficie, puesto que no todas las orientaciones facilitan la comunicación con el transductor.

Existen diferentes métodos para inmovilizar enzimas sobre superficies electrónicas⁸, siendo los más comunes: adsorción física, atrapamiento físico, entrecruzamiento y enlace covalente directo.

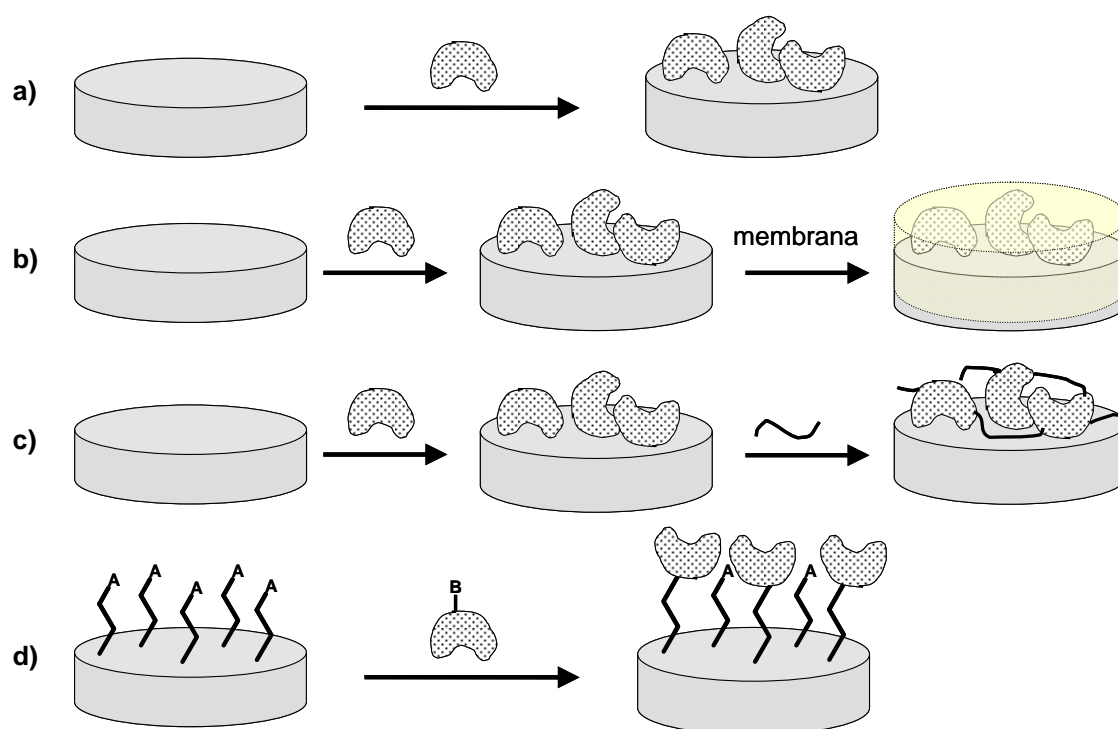


Figura 1.2. Inmovilización de enzimas en superficies. **a)** adsorción física; **b)** atrapamiento físico por membrana; **c)** entrecruzamiento; **d)** unión covalente.

a) Adsorción física

Es el método más sencillo, puesto que simplemente requiere el contacto entre la superficie electródica (desnuda o funcionalizada) y la enzima (figura 1.2.a). La enzima se retiene en la superficie por fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas o interacciones electrostáticas, siendo posible en este caso controlar la orientación con una funcionalización de la superficie adecuada a la distribución de cargas de la proteína.

Este tipo de unión tiene la ventaja de que no suele implicar pérdidas importantes de actividad enzimática. Sin embargo, la mayor desventaja de este método es la baja fortaleza del enlace, dando como resultado la pérdida de enzima por cambios de pH, fuerza iónica o simple difusión al medio.

b) Atrapamiento físico

En este método la enzima es retenida físicamente en el interior de una matriz sólida porosa (un polímero altamente entrecruzado o un gel) o encapsulada dentro de una membrana semipermeable (figura 1.2.b).

Este método produce una unión estable, no suele alterar la estructura de la proteína, por lo que mantiene su actividad, y es un método sencillo para la

coimmobilización de distintas proteínas. Además, el uso de polímeros redox conductores puede mejorar la transferencia directa entre la enzima y el electrodo. Sin embargo, pueden producirse grandes barreras difusionales de sustratos.

c) Entrecruzamiento

En este caso se utilizan agentes entrecruzantes (glutaraldehído, polietilenimina) con los que el enzima puede establecer enlaces intermoleculares covalentes con otras enzimas (figura 1.2.c). De esta forma se previene la pérdida de actividad por difusión al medio. Sin embargo, es difícil controlar la reacción y requiere una modificación de la estructura de la proteína que puede afectar a su actividad y estabilidad.

d) Enlace covalente directo

Esta metodología requiere de superficies electródicas funcionalizadas a las que se unirá la enzima mediante enlace covalente (figura 1.2.d). Las ventajas de esta metodología son:

- estabilidad de la monocapa de enzima ante cambios en las condiciones del medio,
- mayor reproducibilidad en el recubrimiento de enzima,
- posible orientación de la proteína en la superficie,
- posible cercanía del centro activo de la enzima con la superficie electródica, lo que puede hacer posible la transferencia electrónica directa enzima-electrodo.

Sin embargo, puesto que la enzima se une covalentemente a la superficie, su estructura se ve alterada, lo que podría conllevar la pérdida de actividad de la misma. Por lo tanto, hay que tener cuidado con la elección del procedimiento de inmovilización química con el fin de evitar la desnaturalización y consiguiente inactivación de la proteína.

Hay una amplia variedad de procedimientos para la inmovilización covalente de proteínas a superficies según la funcionalización de los electrodos⁸. De ellos comentaremos los dos que se utilizan en la presente tesis:

- Formación de enlace amida, para enlazar aminas a ácidos carboxílicos, utilizando carbodiimida como activador de los grupos carboxílicos. En dicha reacción, la N-etil-N-dimetilaminopropil-carbodiimida (EDC) convierte el ácido carboxílico en un intermedio reactivo que es susceptible de ser atacado por aminas. El uso conjunto de EDC y N-hidroxisuccinimida (NHS) da lugar a un intermedio reactivo más estable que favorece la reacción de inmovilización⁹⁵.
- Formación de enlace imina o base de Schiff entre grupos amino y aldehídos. Se trata de una reacción espontánea que tiene lugar a pH neutro. Los grupos aldehídos se pueden

obtener por oxidación con peryodato de alcoholes, pudiendo éstos estar presentes en la superficie electródica o en los azúcares de las proteínas⁴⁴.

1.3. Funcionalización de superficies

Mediante la funcionalización de una superficie es posible cambiar sus propiedades. Así, se pueden insertar moléculas o grupos funcionales que cambien el carácter hidrófobo o la carga superficial de la superficie, o que aporten puntos de atracción o anclaje a moléculas que no pueden ser unidas directamente a la superficie. De esta forma al inmovilizar enzimas sobre electrodos funcionalizados se puede favorecer su orientación y permitir la unión covalente entre la enzima y el electrodo.

Según la naturaleza de la superficie (metálica, conductora, etc.), existen diferentes métodos de funcionalización. A continuación se detallan los métodos más comunes para la funcionalización de superficies metálicas y de carbono con el fin de obtener electrodos modificados químicamente.

1.3.1. Superficies metálicas

El método más popular y sencillo para la funcionalización de superficies metálicas es la formación de monocapas autoensambladas (SAMs), unas estructuras ordenadas, compactas y estables que ciertas moléculas orgánicas forman sobre determinadas superficies sólidas.

Existen varios métodos para formar SAMs, dependiendo de la molécula y la superficie utilizadas, siendo el método más estudiado la adsorción de alcanotioles sobre oro, plata, cobre, paladio, platino y mercurio⁶³. La quimisorción de alcanotioles sobre dichas superficies es una reacción espontánea que puede realizarse mediante contacto o inmersión de la superficie en una disolución de la molécula que se desea inmovilizar (figura 1.3).

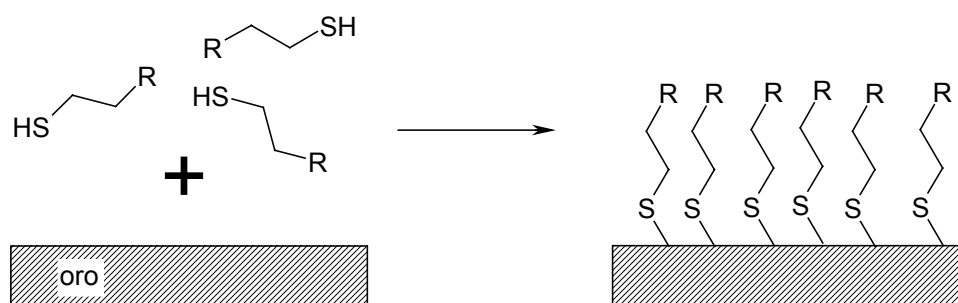
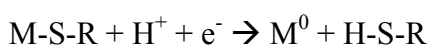


Figura 1.3. Esquema de la formación de SAM de tioles en superficies metálicas.

Varios parámetros afectan a la formación de monocapas de tioles por inmersión en disolución⁶³:

- Disolvente: su importancia deriva en que para la formación de la monocapa el tiol debe desplazar las moléculas de disolvente de la superficie del sustrato. El disolvente más utilizado es el etanol, puesto que es capaz de disolver la gran mayoría de alcanotioles independientemente de su grado de polaridad o longitud de cadena, se encuentra en un alto grado de pureza, es barato y presenta baja toxicidad.
- Temperatura: temperaturas superiores a 25°C pueden mejorar la cinética de formación y reducir los defectos en la monocapa resultante, aunque temperaturas muy elevadas también aumentan la velocidad de desorción. El efecto de la temperatura es especialmente importante durante los primeros minutos de formación de la monocapa, cuando ocurre la mayor parte de la adsorción.
- Concentración y tiempo de reacción: son dos parámetros interrelacionados: a menor concentración de tioles se requiere mayor tiempo de inmersión. El grado de recubrimiento máximo obtenido para una monocapa compacta es de $\sim 4,5 \cdot 10^{14}$ moléculas cm^{-2} (0,75 nmol cm^{-2}). En general, a partir de disoluciones de tioles ~ 1 mM el recubrimiento de las monocapas obtenidas es reproducible, siendo necesarios tiempos de incubación de 12-18 horas para obtener monocapas altamente organizadas. Menores tiempos también ofrecen un alto grado de recubrimiento, pero con menor organización.
- Limpieza del sustrato: aunque los tioles son capaces de desplazar impurezas adsorbidas sobre la superficie del sustrato, estas impurezas pueden disminuir la velocidad de adsorción del tiol. Un tratamiento previo del electrodo que sea fuertemente oxidativo (disolución piraña) puede mejorar la reproducibilidad en la formación de la SAM.

Las principales ventajas de este método de funcionalización de superficies de oro son la sencillez del procedimiento, el alto grado de control de la organización molecular, la formación de monocapas compactas y orientadas y su alta estabilidad térmica. Sin embargo las SAMs obtenidas a partir de tioles no son estables a potenciales negativos, a los cuales se produce la desorción del grupo tiol de la superficie de acuerdo con la reacción:



La estabilidad de las SAMs varía dependiendo del tipo de tiol que se utilice (aromático o alifático) y de la longitud de su cadena, siendo los tioles alifáticos de cadena corta los que menor estabilidad presentan.

1.3.2. Superficies de carbono

La funcionalización de superficies de carbono se remonta a 1977, cuando el grupo de Mazur reportó un método para la generación de radicales en la superficie del carbón a través de un tratamiento térmico bajo vacío⁶⁸. Desde entonces nuevos métodos para la modificación de este tipo de superficies se han desarrollado basándose en la química del carbono. La modificación electroquímica de superficies de carbono es una técnica desarrollada más recientemente. Su origen se puede establecer en 1990, cuando Barbier describió por primera vez la generación electroquímica de radicales en disolución que parecían unirse covalentemente a la superficie de carbono¹¹.

La modificación electroquímica de superficies de carbono presenta una serie de ventajas frente a otros tipos de modificación³⁶:

- Es un método experimental sencillo, rápido y que sólo requiere instrumentación electroquímica básica.
- La superficie puede modificarse con una gran variedad de monocapas, bien a partir de reactivos comerciales o mediante sencillas reacciones de diazotización de arilaminas.
- La unión de la monocapa a la superficie es covalente, lo que le ofrece gran estabilidad frente a medios extremos (tanto acuosos como no acuosos), elevadas temperaturas y potenciales aplicados.
- El control de la densidad de la monocapa es fácil y reproducible, pudiendo obtener superficies con un bajo recubrimiento o modificadas con una monocapa compacta, mediante el control del potencial y/o el tiempo de modificación.

Sin embargo, este tipo de modificación también presenta desventajas, siendo las dos principales³⁶:

- La formación de multicapas, cuyo control requiere un mayor estudio. No obstante, se puede reducir su formación mediante la cuidadosa elección del potencial y tiempo de modificación.
- El uso de carbono como sustrato impide la obtención de monocapas con un alto grado de ordenación, debido a que el carbón (con la excepción del *HOPG*, *Highly Oriented Pyrolytic Graphite*) presenta una superficie heterogénea. También hay que tener en cuenta que el carbón es más reactivo electroquímicamente en el plano *edge* que en el plano *basal*, lo que afecta al recubrimiento, que será mayor en los planos *edge*^{6, 10}.

Los métodos más relevantes para la modificación electroquímica de superficies de carbono son los siguientes:

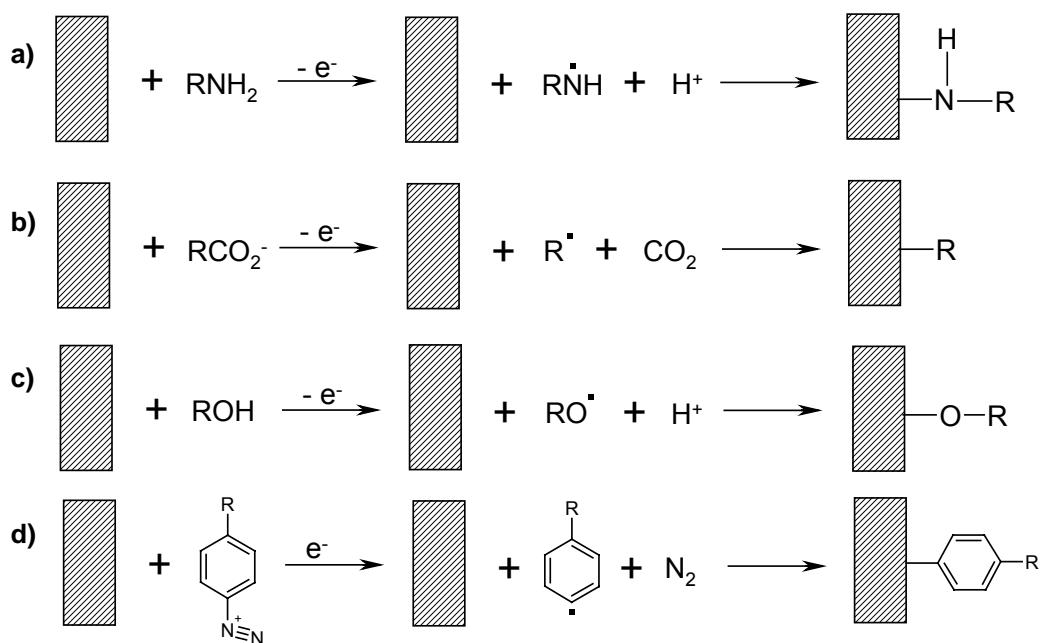


Figura 1.4. Mecanismos de la funcionalización electroquímica de superficies de carbono. a) oxidación de aminas; b) oxidación de arilacetatos; c) oxidación de alcoholes; d) reducción de cationes arildiazonio.

a) Oxidación de aminas

La unión entre aminas y superficies de carbono a través de la oxidación de la amina en medio anhidrico (etanol, acetonitrilo) sigue el mecanismo representado en la figura 1.4.a. El recubrimiento partiendo de aminas primarias es de aproximadamente una monocapa¹¹, mientras que las aminas secundarias presentan un bajo grado de recubrimiento y las aminas terciarias no se unen a la superficie³¹, lo que está de acuerdo con el mecanismo propuesto que requiere la pérdida de un protón por parte de la amina para formar un protón radical, reacción que no es posible en el caso de aminas terciarias.

b) Oxidación de arilacetatos

La oxidación de arilacetatos en medio acetonitrilo ha sido investigada por el grupo de Savéant y cols.⁶. El mecanismo propuesto se basa en la reacción de Kolbe, que implica la eliminación de CO_2 formando un radical que se une covalentemente al electrodo (figura 1.4.b).

c) Oxidación de alcoholes

Un electrodo de carbono vitrificado expuesto a altos potenciales positivos (+2 V vs. ENH) en presencia de disoluciones anhidras de alcoholes alifáticos primarios se

pasiva debido a la unión del alcohol a la superficie mediante formación de enlace éster⁶⁴ (figura 1.4.c).

d) Reducción de cationes arildiazonio

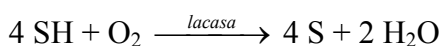
Las superficies pueden ser modificadas con grupos arilos mediante la reducción de sales de diazonio en electrodos de carbono, de acuerdo con el mecanismo que se muestra en la figura 1.4.d³². Los primeros estudios se realizaron usando acetonitrilo como disolvente, aunque estudios recientes demuestran que también pueden usarse medios acuosos ácidos (pH<2)³⁶. Esta reducción se puede llevar a cabo mediante voltametría o electrólisis a potencial controlado.

1.4. Lacasas

La lacasa fue una de las primeras enzimas en ser descritas, gracias a Yoshida que la extrajo en 1883 de los exudados de *Rhus vernicifera* (*japanese lacquer tree*, árbol de la laca). Algunos años después, en 1896, Bertrand demostró su existencia en hongos. Desde entonces se han encontrado en numerosos hongos y plantas, así como en algunas bacterias e incluso en insectos. En los últimos años se han publicado varias revisiones^{9, 28, 37, 59, 67, 70, 71, 87, 92, 98, 103} que abarcan todos los aspectos relacionados con las lacasas: estructura, función, propiedades y aplicaciones. A continuación se resumen las principales características de las lacasas, fijando la atención especialmente en las lacasas de hongo, clase a la que pertenece la lacasa de *Trametes hirsuta* usada en la presente tesis.

1.4.1. Características generales

Las lacasas (oxígeno oxidoreductasas, EC 1.10.3.2) pertenecen a la familia de las enzimas multicobre, y se caracterizan por su capacidad de catalizar la reacción de reducción de oxígeno molecular a agua, acoplada a la oxidación de diferentes sustratos, como pueden ser fenoles, aminas, ligninas y algunos compuestos inorgánicos, de acuerdo con la reacción:



Como se ha comentado, las lacasas se encuentran fundamentalmente en plantas y hongos, y su función se relaciona con la lignificación (síntesis y degradación), aunque su mecanismo de actuación no está del todo esclarecido. En plantas también se relaciona su actividad con la protección frente a patógenos y la eliminación de fenoles, mientras que en hongos se asocia a diversos procesos celulares como esporulación y producción

de pigmentos. Así, la gran mayoría de las lacasas se localizan fuera de la célula, aunque existe un pequeño porcentaje (5-12 %) de lacasas intracelulares⁷¹.

Más de un centenar de lacasas han sido aisladas y caracterizadas, especialmente las extraídas de hongos, siendo las de plantas menos estudiadas. Los trabajos de Baldrian y cols.⁹ y Morozova y cols.⁷¹ presentan sendas tablas que resumen las características de gran parte de las lacasas aisladas, tanto de hongo como de planta.

En general, las lacasas son glicoproteínas con un peso molecular de 50-130 kDa, siendo las de hongo menores (60-70 kDa). El porcentaje de carbohidratos, presentes como manosa, N-acetilglucosamina y galactosa, representa cerca de un 45 % de la masa de las lacasas de planta y un 10-20 % en las lacasas de hongo.

Las lacasas de hongo tienen un punto isoelectrico cercano a 4,0, su pH óptimo de actividad es generalmente ácido, y su temperatura óptima de funcionamiento se encuentra entre 50 y 70 °C, aunque la estabilidad a dichas temperaturas varía mucho de unas lacasas a otras.

1.4.2. Estructura

La estructura tridimensional ha sido descrita para diferentes lacasas de hongos, presentando una gran analogía entre ellas. Las diferencias se encuentran especialmente en la organización de los bucles y en la formación del “bolsillo” al que se une el sustrato⁷¹.

La mayoría de lacasas son monoméricas, con tres dominios globulares conectados consecutivamente, y contienen cuatro iones cobre, repartidos en tres diferentes centros (figura 1.5.a). El centro T1 se localiza en el tercer dominio, mientras que los centros T2 y T3 se encuentran entre el primer y el tercer dominio formando el “cluster” o agrupamiento T2/T3. Existen dos canales que permiten el acceso de disolventes hacia el centro T2/T3, uno con acceso directo al centro T3, por el que entrará el O₂ que se unirá a los cobres, y otro simétrico, con acceso al T2, por el que el agua será expulsada al exterior^{14, 66}. Los residuos aminoácidos del segundo y tercer dominio están involucrados en la formación del bolsillo al que se une el sustrato.

Una de las lacasas cuya estructura ha sido resuelta, mediante estudios de difracción de rayos-X a una resolución de 1,9 Å, es la de *Trametes versicolor*⁷⁹, un enzima muy similar a la usada en este trabajo, aislada de *Trametes hirsuta*. Se trata de una proteína globular cuyas dimensiones son 65 x 55 x 45 Å. El centro T1 se encuentra a unos 6,5 Å bajo la superficie del enzima y se conecta a través de un tripéptido

histidina-cistamina-histidina al centro T2/T3, que se encuentra a unos 12 Å de distancia (figura 1.6). En la *T. versicolor* también se ha observado que el sustrato se une a una pequeña cavidad negativamente cargada cercana al centro T1⁷⁹.

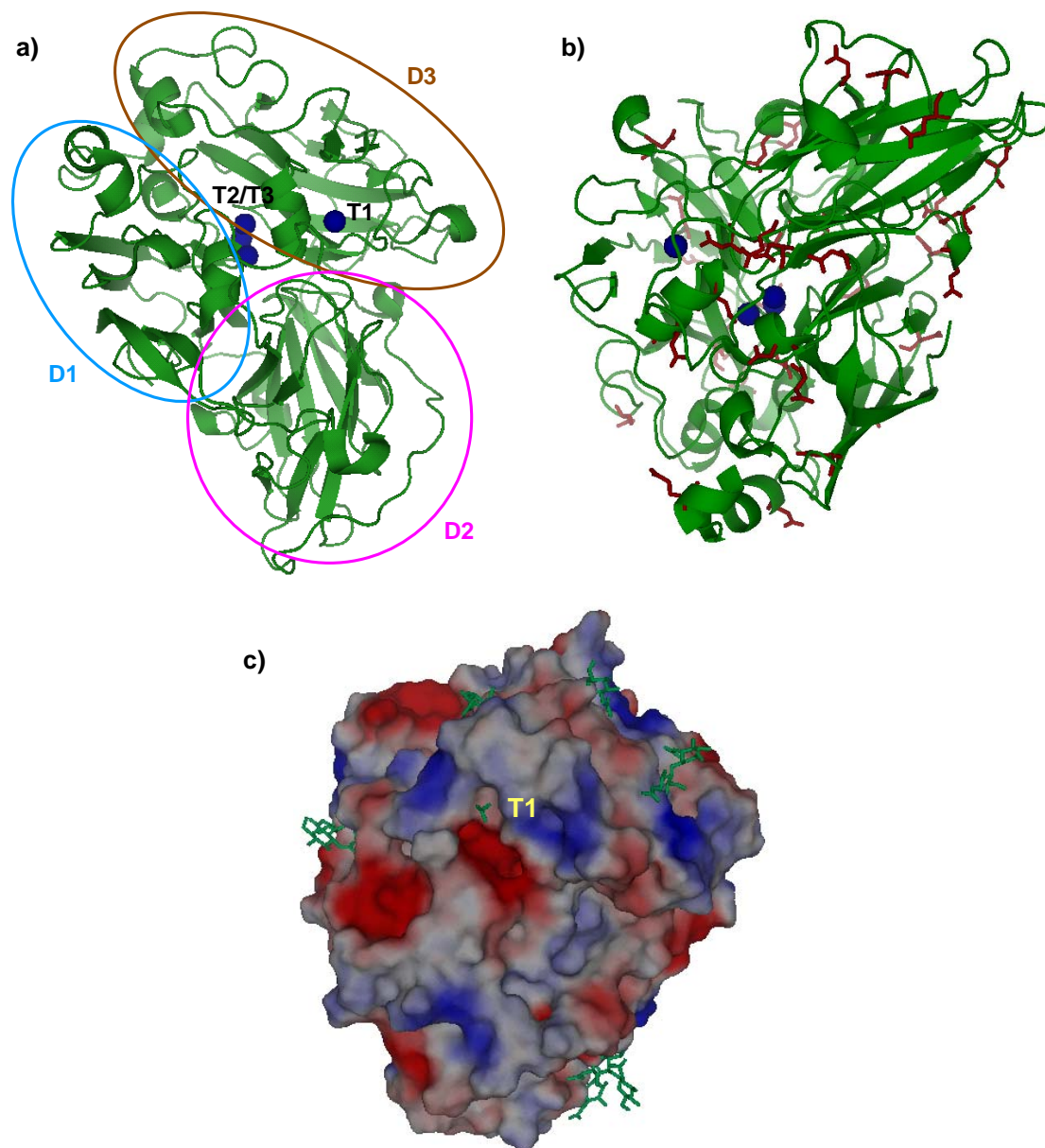


Figura 1.5. Estructura de la lacasa de *T. versicolor*, modelada con el programa PyMOL a partir del archivo 1GYC del *Protein Data Bank*. Resaltados en azul los centros cobre. **a)** Marcados los tres dominios de la lacasa (D1, D2 y D3). **b)** Marcados en rojo los grupos aspárticos y glutámicos. **c)** Distribución de cargas (azul carga positiva, rojo carga negativa) y de azúcares (marcados en verde). Perspectiva desde el centro T1.

En la figura 1.5.b puede apreciarse la distribución de los residuos aspártico y glutámico en la estructura de la lacasa de *T. versicolor*. Los grupos carboxílicos de estos residuos pueden formar enlace amida con residuos amino, pudiendo de esta forma unir

covalentemente la enzima a superficies convenientemente funcionalizadas. Cabe destacar que dichos residuos son abundantes en la cercanía del centro T1, lo que permitirá unir la enzima a través de ellos en una orientación en la que dicho centro se encuentre hacia el electrodo.

En la figura 1.5.c se distingue la distribución de azúcares en la superficie de la lacasa. Cabe destacar que, aunque se distribuyen en tres regiones, su presencia es mayor en las cercanías del centro T1. Esta distribución será de especial interés cuando la inmovilización se lleve a cabo mediante formación de base de Schiff entre los restos azúcares oxidados de la lacasa y grupos aminos de la superficie electródica.

En cuanto a la distribución de cargas (figura 1.5.c), que tendrá especial interés en la orientación de la lacasa en una monocapa cargada, no presenta una clara tendencia. Sin embargo, como ya se ha comentado, la carga superficial de la lacasa es negativa, con una región cargada negativamente en la región próxima al centro T1⁷⁹.

1.4.3. Centros de cobre

Como ya se ha comentado, el centro activo de las lacasas contiene cuatro iones cobre, presentes en el estado oxidado como Cu (II), repartidos en tres diferentes centros que se clasifican por sus diferentes espectros y características EPR^{9, 28, 70, 93}:

- Centro T1: contiene un ión. Se caracteriza por la pronunciada banda de adsorción a 600 nm ($\epsilon \sim 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y por un estrecho desdoblamiento en el espectro EPR ($g_{\parallel}=2,30$, $A_{\parallel}=(40-95) 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$). Los ligandos del sitio T1 son dos histidinas, a las que se une a través de un nitrógeno, y una cisteína, a la que se une a través del grupo sulfuro (figura 1.6). Esta unión entre el cobre del centro T1 y el azufre es el que proporciona el color azul característico de las lacasas³⁹. Algunas lacasas presentan otro ligando en posición axial, a una distancia mayor, que generalmente es una metionina o un aminoácido alifático.
- Centro T2: contiene un ión cobre. Presenta un estrecho desdoblamiento en el espectro EPR ($g_{\parallel}=2,24$, $A_{\parallel}=(140-200) 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$). Sus ligandos son un hidroxilo y dos histidinas, a las que se une a través de un nitrógeno (figura 1.6).
- Centro T3: contiene dos iones cobre unidos por un puente de una especie de oxígeno (OH^- u O_2^{2-}). Cada cobre presenta además otros tres ligandos histidina a los que se une a través de un nitrógeno (figura 1.6). Este sitio presenta un hombro a 330 nm en el espectro visible.

La cisteína del centro T1 se encuentra unida a las histidinas de los T3, lo que proporciona un camino electrónico de enlaces covalentes entre los centros de cobre⁹³ (figura 1.6).

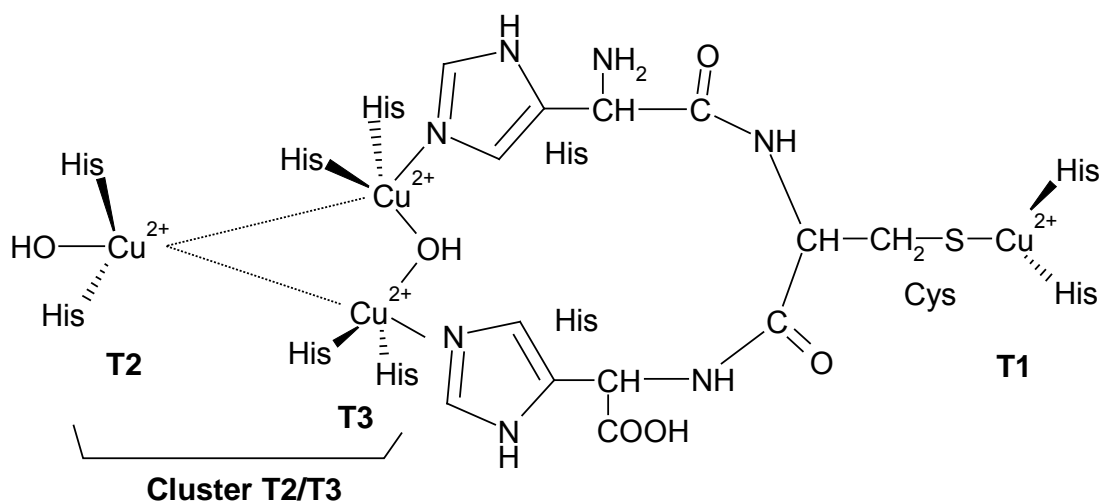


Figura 1.6. Centros de Cu de la lacasa (modificado de Solomon y cols.⁹³). Los cobres se encuentran coordinados a histidinas (His), cistaminas (Cys) o hidroxilos (OH). El camino electrónico que une el centro T1 con el cluster T2/T3 se muestra detallado.

1.4.4. Potencial redox del centro T1

Una característica por la cual se diferencian las distintas lacasas es el potencial de sus centros redox. El potencial de los centros T2 y T3 ha sido determinado para contadas lacasas⁹⁰, sin embargo el potencial del centro T1 es conocido para gran número de lacasas⁷¹. Según el potencial de este centro, las lacasas se pueden clasificar en lacasas de alto y bajo potencial. Se consideran de alto potencial aquellas cuyo centro T1 tiene un potencial entre 790-700 mV *vs.* ENH, y de bajo potencial aquellas en las que tiene un valor de 650-430 mV *vs.* ENH.

En un principio se pensaba que el potencial del centro T1 estaba relacionado con el tipo de aminoácido coordinado en posición axial, puesto que las lacasas de alto potencial presentan un residuo fenilalanina como ligando axial del cobre T1, mientras que las de bajo potencial presentan un residuo leucina o metionina^{71, 82}. Sin embargo, estudios de mutagénesis dirigida de diferentes lacasas han demostrado que el entorno del cobre T1 no tiene gran influencia en su potencial, y, por ejemplo, el cambio del residuo leucina por fenilalanina apenas varía el potencial¹⁰². Por otro lado, Piontek y cols.⁷⁹ han sugerido que un incremento en la distancia del enlace cobre-nitrógeno (de la

histidina) aumenta el potencial del centro T1 debido a una disminución de la contribución del par electrónico libre del nitrógeno. Dicho aumento en la distancia Cu-N se daría por formación de un enlace de hidrógeno, entre un residuo glutámico, presente solo en las lacasa de alto potencial, cercano al centro T1 y un residuo serina presente en el dominio 1, que afecta a la estructura de la lacasa incrementando la distancia de la histidina al cobre⁷⁹. Más recientemente Durão y cols.³⁸ señalan que la accesibilidad de las moléculas de agua al centro activo estabilizarían el estado oxidado del centro, al contribuir con la carga negativa del oxígeno, disminuyendo el potencial redox del mismo. Matera y cols.⁶⁶ defienden que el potencial redox del centro T1 no se puede atribuir a un solo factor, sino que a él contribuyen tanto la naturaleza de los ligandos y su geometría de coordinación, como otros residuos presentes en la estructura que varían el entorno del centro T1, siendo preciso varias mutaciones para variar el potencial redox del centro T1 de la lacasa de *T. trogl*⁶⁶.

1.4.5. Propiedades catalíticas

Como hemos visto, las lacasas son enzimas capaces de catalizar la reducción de oxígeno molecular a agua. A grandes rasgos, el centro T1 acepta electrones del sustrato en cuatro pasos monoeléctricos, y se los pasa al centro T2/T3, que los transmite al oxígeno en dos pasos bielectrónicos. El ciclo catalítico completo conlleva la reducción total del oxígeno formando dos moléculas de agua, para lo cual se oxidan cuatro moléculas de sustrato (figura 1.7.a).

Aunque no hay una idea definitiva acerca del camino electrónico dentro de la proteína, ni del mecanismo por el que se produce la reducción del oxígeno, se sabe que implica la formación de un intermedio peróxido^{56, 85}.

Un esquema del ciclo catalítico de reducción de oxígeno, basado en estudios espectroscópicos y cristalográficos, puede verse en la figura 1.7.b. Partiendo del intermedio nativo de la lacasa, el sustrato se oxida reduciendo el centro T1, que transmite los electrones al cluster T2/T3, a través de los enlaces covalentes de la cadena cistamina-2 histidina⁹³ (figura 1.6), formando el intermedio totalmente reducido. La forma totalmente reducida del enzima interacciona con una molécula de oxígeno, obteniendo un intermedio peróxido en el que dos de los cobres se encuentran oxidados. En un segundo paso de reducción bielectrónico, se regenera el intermedio nativo con desprendimiento de agua. Aunque este es un modelo de ciclo catalítico ampliamente aceptado^{37, 90, 92, 93}, Bento y cols, a partir de estudios de rayos de X de la estructura de la

lacasa de *CotA*¹⁴, sostienen que la entrada de oxígeno en la estructura se produce cuando todos los centros se encuentran oxidados, obteniéndose sólo la forma totalmente reducida en ausencia de oxígeno. El resto del ciclo propuesto por Bento y cols.¹⁴ es similar al detallado antes, formándose en una primera etapa bielectrónica el intermedio peroxido, que pasará en la segunda etapa a dos grupos hidroxilos que serán expulsados en forma de agua a través del cobre T2, obteniendo de nuevo la estructura oxidada.

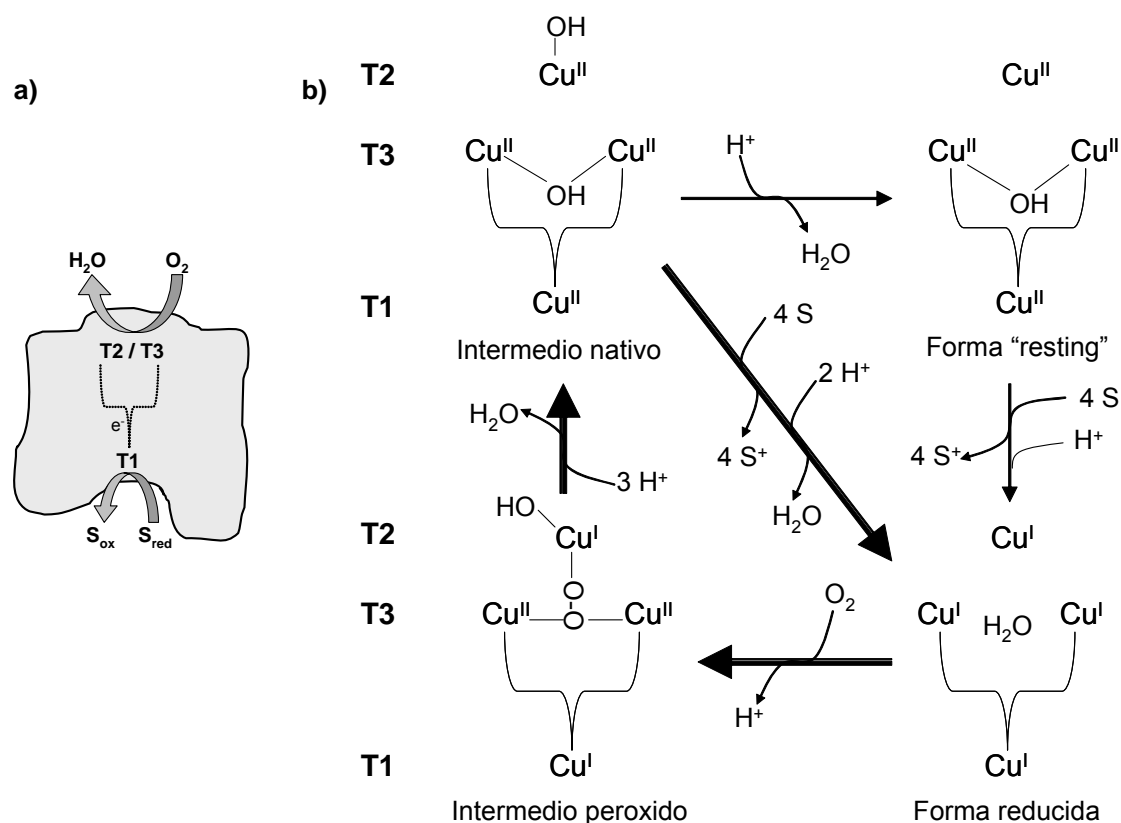


Figura 1.7. a) Reacción catalítica de la lacasa. b) Ciclo catalítico de la lacasa. S representa una molécula de sustrato en su forma reducida.

El intermedio nativo representado en la figura 1.7b puede pasar a una forma “resting” por pérdida de un hidroxilo⁹⁰. Dicha forma es una forma activa de la lacasa, aunque presenta una cinética más lenta, por lo que en presencia de sustrato el intermedio nativo evoluciona hacia el intermedio totalmente reducido, repitiendo así el ciclo catalítico⁹².

Solomon y cols.⁹³ postulan dos posibles mecanismos que conllevan a la reducción del cluster T2/T3: 1) el cluster trinuclear es reducido secuencialmente por electrones que le llegan a través del T1; 2) en un primer paso el cobre del centro T1, reducido por el sustrato, pasa los electrones al T2. En un segundo paso el T1, nuevamente reducido por el sustrato, y el T2 pasan sendos electrones a los cobres T3.

En la siguiente reducción el T1 pasa de nuevo un electrón al T2 y en el cuarto paso el centro T1 se reduce de nuevo, obteniendo una estructura en la que todos los cobres se encuentran reducidos.

1.4.6. Sustratos

Como aceptores de electrones las lacasas aceptan un gran número de compuestos fenólicos, a excepción de la tirosina, así como aminas, ligninas y algunos iones inorgánicos como $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. La mejor manera de caracterizar la enzima es determinando las constantes cinéticas (K_M y k_{cat}) para varios sustratos, pudiendo variar su valor varios órdenes de magnitud entre los mismos. Los sustratos más comúnmente utilizados en estudios con lacasas son $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, 2,2'-azidobis(3-etilbenzotiazoline-6-acido sulfónico) (ABTS), catecol, hidroquinona, guaiacol y 2,6-dimetoxifenol (figura 1.8). El trabajo de Baldrian⁹ ofrece una tabla detallada con los sustratos usados con lacasas de hongo.

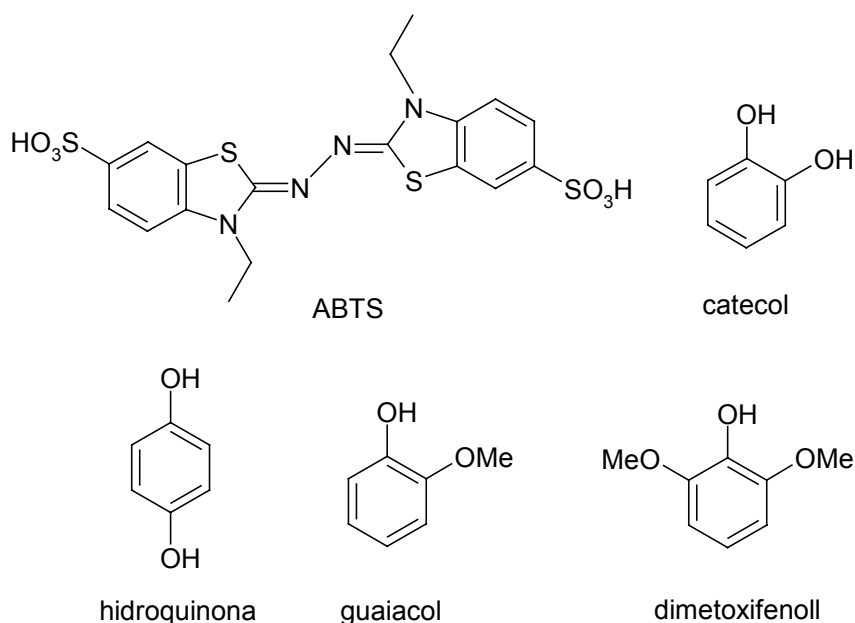
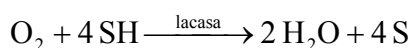


Figura 1.8. Sustratos fenólicos más comunes de las lacasas.

La reacción catalítica implica la reducción tetraelectrónica del oxígeno acoplada a la oxidación monoelectrónica del sustrato. Por lo tanto, por cada molécula de oxígeno se generan dos moléculas de agua consumiendo cuatro moléculas de sustrato. De forma esquemática dicha reacción se puede escribir como:



Como ya se ha mencionado antes, el oxígeno se reduce en el cluster T2/T3, al que accede a través de un canal que comunica el cluster con el exterior. Por otra parte, el centro T1 es el encargado de extraer los electrones del sustrato. Un estudio de la estructura cristalina de la lacasa de *CotA* en presencia de ABTS realizado por el grupo de Enguita y cols.⁴⁰ demostró que el sustrato se une en una cavidad, cercana al centro T1, formada por residuos apolares (histidina, alanina, glicina). En ese estudio se observó que el ABTS se encuentra sólo parcialmente embebido en la estructura de la lacasa. Teniendo en cuenta dicha estructura obtuvieron un modelo en el cual, para la parte del ABTS inmersa en la cavidad, se establecería un puente de hidrógeno entre el oxígeno del sulfonato del ABTS y una glicina de la lacasa. Por otro lado, el grupo de Bertand y cols.¹⁵ reportaron en la estructura de la lacasa de *T. versicolor* la presencia de 2,5-xilidina en una cavidad bastante amplia cercana al centro T1. La 2,5-xilidina es una arilamina usada como inductor del crecimiento en cultivos de lacasa, pudiendo actuar también como sustrato. En este caso también existen interacciones hidrofóbicas entre el sustrato y la cavidad (con residuos fenilalanina y leucocina) y se establecen dos puentes de hidrógeno con la arilamina, uno con un residuo histidina coordinado al centro T1 y otro con el oxígeno terminal de un grupo aspartato. Recientemente Matera y cols.⁶⁶ han reportado la estructura de la *T. trogii* con el p-tolueno alojado en la cavidad cercana al T1, observando que se forma un puente de hidrógeno entre el carboxilato del sustrato y una histidina de la lacasa, así como la existencia de interacciones hidrofóbicas con residuos fenilalanina, prolina y valina de la lacasa. En resumen, estos estudios indican que en la unión sustrato-lacasa son importantes tanto las interacciones hidrofóbicas como la posibilidad de establecer puentes de hidrógeno.

1.4.7. Inhibidores

Las lacasas son inhibidas fuertemente por una gran variedad de compuestos⁹. Entre ellos destacaremos haluros, azidas, cianuros, hidroxilos y otros pequeños aniones. Se piensa que dichos aniones se unen al cluster T2/T3 interrumpiendo la transferencia electrónica con el T1 y, por tanto, la catálisis^{73, 94, 102}. Sin embargo, no todas las lacasas son inhibidas por el mismo anión en el mismo grado. Esto puede ser explicado debido a la diferente accesibilidad de los aniones al canal que comunica el cluster con el exterior¹⁰¹. Así mismo se ha comprobado que la cinética de inhibición de la catálisis mediada varía entre el fluoruro y el resto de haluros⁷² lo que podría deberse a la menor accesibilidad al cluster T2/T3 de los aniones de mayor tamaño.

1.4.8. Transferencia electrónica lacasa-electrodo

Cuando una enzima redox es inmovilizada de forma que el centro activo se encuentra a una distancia adecuada del electrodo, es posible la transferencia electrónica directa (TED) entre la enzima y el electrodo. La inmovilización de la enzima en electrodos desnudos o funcionalizados con monocapas cortas o conductoras ofrece una distancia adecuada para la obtención de TED. En este caso los electrones se transmiten directamente desde el electrodo hasta el centro activo de la enzima, para lo que es necesario que el centro activo se encuentre orientado hacia el electrodo.

Para el caso de las lacasas, existen dos posibilidades de TED: cuando el centro T1 se encuentra orientado hacia el electrodo, o cuando es el cluster T2/T3 el que se encuentra orientado hacia el electrodo (figura 1.9.a y b). En estos casos, una medida electroquímica en presencia de oxígeno resultará en la obtención de una corriente catalítica directa (CCD) debida a la reducción total de oxígeno a agua, en el caso de que sea el centro T1 el que se encuentra orientado hacia el electrodo (figura 1.9.a), o la reducción parcial de oxígeno a peróxido de hidrógeno, en el caso de que la orientación sea a través del centro T2/T3 (figura 1.9.b)⁸⁹.

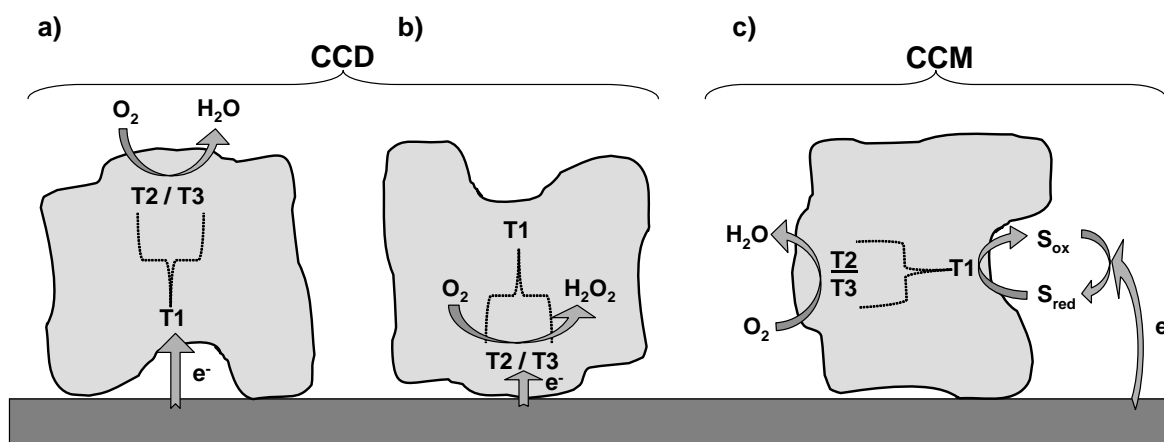


Figura 1.9. Posibles orientaciones de la lacasa en el electrodo. **a)** centro T1 en TED con el electrodo; **b)** centro T2/T3 en TED con el electrodo; **c)** sin TED con el electrodo, requiere la presencia de mediadores redox (S).

Como hemos visto, la obtención de TED está condicionada a la distancia a la que se encuentra el centro activo del electrodo, y, por tanto, a la orientación de la enzima. Sin embargo en la mayoría de los estudios publicados la lacasa se encuentra dispuesta al azar en el electrodo, siendo necesario en estos casos establecer contacto electrónico entre todas las moléculas de enzima activa y el electrodo mediante el uso de

mediadores redox. Un mediador redox es generalmente un sustrato de la enzima que tiene unas propiedades determinadas:

- el potencial redox del mediador y de la enzima están cercanos,
- presenta una electroquímica reversible o cuasi-reversible,
- ambas formas del mediador, oxidada y reducida, son estables.

Este tipo de transferencia se conoce como transferencia electrónica mediada (TEM), puesto que es el mediador el que toma los electrones del electrodo y los transporta hasta el centro activo de la enzima (figura 1.9.c). Para el caso de la enzima lacasa, medidas electroquímicas en presencia de oxígeno darán como resultado la obtención de corrientes catalíticas mediadas (CCM)⁵³.

1.4.9. ABTS como mediador

ABTS, catecol y ferricianuro son buenos mediadores para el centro T1 de las lacasas de alto potencial. En la presente tesis se ha elegido el ABTS como mediador en la mayoría de los ensayos.

El ABTS presenta una banda de absorción a 340 nm y se oxida dando un catión radical (ABTS^{•+}) con un máximo de absorción a 414 nm, ambas formas con un coeficiente de adsorción molar $\epsilon = 3,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El catión radical ABTS^{•+} no es estable, y desproporciona lentamente en ABTS y un azodicatión (ABTS²⁺)²⁵ (figura 1.10).

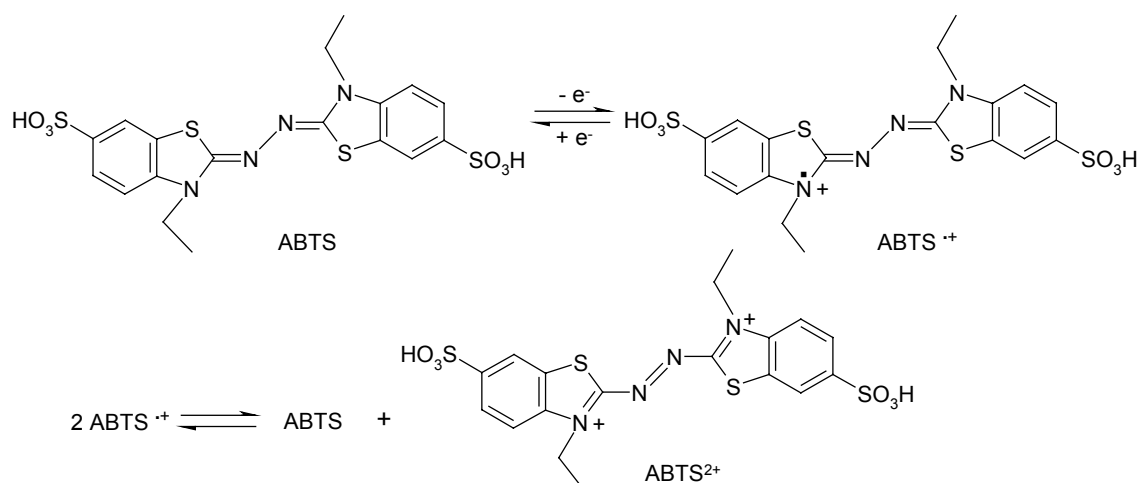


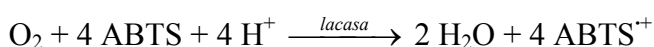
Figura 1.10. Especies redox del ABTS²⁵.

De forma electroquímica es posible oxidar totalmente el ABTS, puesto que sus formas oxidadas son relativamente estables (la velocidad de desproporción es muy lenta respecto a la medida electroquímica) y presentan una electroquímica reversible. Los

potenciales obtenidos para el sistema del ABTS en electrodos de carbono vitrificado son 690 mV vs. ENH para ABTS/ABTS^{•+}, y 1100 mV vs. ENH para ABTS^{•+}/ABTS²⁺ ¹⁹.

En resumen, el ABTS es un sustrato de la lacasa que presenta una electroquímica reversible con un potencial redox próximo al del centro T1 de las lacasas de alto potencial ($E_{T1}=780$ mV vs. ENH para la de *T. hirsuta*) y cuyas especies oxidada y reducida son relativamente estables. Es decir, cumple todos los requisitos señalados anteriormente para utilizarlo como mediador.

Cuando se utiliza ABTS como sustrato de la lacasa para la reducción de oxígeno a agua, la reacción que tiene lugar es la oxidación del ABTS al catión radical, de acuerdo con la ecuación,



1.4.10. Lacasa de *Trametes hirsuta*

La lacasa usada durante la presente tesis es una lacasa de hongo de alto potencial, la extraída de *Trametes hirsuta*, con la que Shleev y cols. han realizado un amplio estudio de caracterización^{86, 88, 91}. Aunque todavía no se conoce su estructura cristalina, se cree que será análoga a la de *Trametes versicolor* debido a la similitud de ambas enzimas.

MW (kD)	70 ± 2
pI	4,2 ± 0,1
pH optimo	3,5 - 4,5
contenido de carbohidratos (%)	12 ± 1
vida media de inactivación a 50 °C (h)	65

Tabla 1.1. Propiedades bioquímicas de la lacasa *T. hirsuta*⁹¹.

T1			T2		T3	
Abs (nm)	g	A 10 ⁻⁴ cm ⁻¹	g	A 10 ⁻⁴ cm ⁻¹	Em (nm)	Ex (nm)
607	2,19	95	2,26	186	418	344

Tabla 1.2. Características espectrales de los centros de Cu de la lacasa de *T. hirsuta*: absorvancia máxima en UV-vis (Abs); parámetros del desdoblamiento (g_{||} y A_{||}) en EPR; y máximos de emisión (Em) y de excitación (Ex) en fluorescencia⁹¹.

Las propiedades bioquímicas (tabla 1.1) y las características espectrales de los centros redox (tabla 1.2) de la *T. hirsuta* se corresponden con su origen fúngico, habiéndose determinado, además, que los carbohidratos que contiene la lacasa son manosa y N-acetilglucosamina⁹¹.

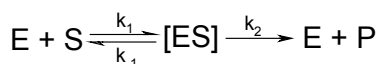
La determinación de las constantes catalíticas (k_{cat}) de la lacasa de *T. hirsuta* respecto a varios sustratos (catecol, guaiacol, hidroquinona, ácido sinapínico y ferricianuro) revelan unos valores superiores para todos los casos en comparación con otras lacasas (*T. ochracea*, *Cerrena maxima* y *Corioloropsis fulvocinerea*), lo que pone de manifiesto su mayor capacidad catalítica⁹¹.

También se han determinado los potenciales redox del centro T1, 780 mV vs. ENH^{86, 91}, y del centro T2, 400 mV vs. ENH⁸⁸, de la lacasa de *T. hirsuta* a pH 6.5. Así mismo, a partir de medidas del potencial a circuito abierto, se determinó que el centro T1 es el primer receptor de electrones cuando la enzima se encuentra inmovilizada por adsorción física sobre electrodos de grafito espectrocópico, siendo posible la obtención de catálisis enzimática de reducción de oxígeno a agua en el electrodo sin necesidad de mediadores⁸⁶.

Las propiedades de la lacasa *T. hirsuta* (alta estabilidad, alta actividad, alto potencial redox) la hacen muy atractiva para estudios y aplicaciones, especialmente para el desarrollo de un biocátodo enzimático, razón por la que se eligió dicha enzima para el presente trabajo.

1.5. Cinética enzimática

Cuando hablamos de cinética enzimática nos referimos a la velocidad con que una enzima cataliza una reacción. Las reacciones catalíticas pueden escribirse como:



Cuando la concentración de sustrato es mayor que la concentración de enzima, y en condiciones de estado estacionario (la concentración del complejo enzima-sustrato es constante), la velocidad de reacción (v) se puede describir con la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{v_{max} \cdot C}{K_M + C} \quad (\text{ecuación 1.1})$$

donde v_{max} es la velocidad máxima que se puede alcanzar a saturación de sustrato; C es la concentración de sustrato en el medio de reacción; y K_M , definida como el cociente

$(k_{-1} + k_2)/k_1$, es la concentración de sustrato con la que la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Por lo tanto, v_{max} nos da una idea de la capacidad de la enzima para convertir el sustrato en producto (etapa limitante), mientras que K_M nos indica la afinidad de la enzima por el sustrato: una mayor K_M indica una menor afinidad por el sustrato y viceversa. Conviene tener en cuenta que v_{max} de la reacción depende de la concentración de enzima, mientras que K_M es independiente. Por ese motivo, en lugar del valor de v_{max} suele ser más interesante el valor de la constante catalítica (k_{cat}), también conocida como número de recambio, cuyo valor, calculado a partir de la v_{max} , es independiente de la concentración de enzima²⁷.

Puesto que no siempre es posible medir experimentalmente la v_{max} de una reacción, se suelen medir las velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (figura 1.11.a). Para calcular de forma sencilla los parámetros K_M y v_{max} , existen diferentes tratamientos de los datos que, partiendo de la ecuación de Michaelis-Menten, ofrecen una representación lineal de la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de reacción²⁷:

Representación de Lineweaver-Burk

Esta representación es la más usada para calcular los parámetros cinéticos. Se basa en una simple conversión matemática de la ecuación de Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max} \cdot C} + \frac{1}{v_{max}} \quad (\text{ecuación 1.2})$$

Representando la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de sustrato se obtiene una línea recta a partir de la cual se pueden calcular la K_M (pendiente) y la v_{max} (ordenada en el origen) (figura 1.11.b).

Sin embargo, este tratamiento de los datos puede dar como resultado un gran error en la medida, puesto que son los puntos de baja concentración de sustrato los que presentan mayor importancia en la regresión lineal, siendo también dichos puntos los que llevan asociado un error de medida mayor (es más difícil medir velocidades bajas). Por lo tanto, una pequeña desviación en la velocidad a concentraciones de sustrato bajas dará como resultado un gran cambio en los parámetros calculados.

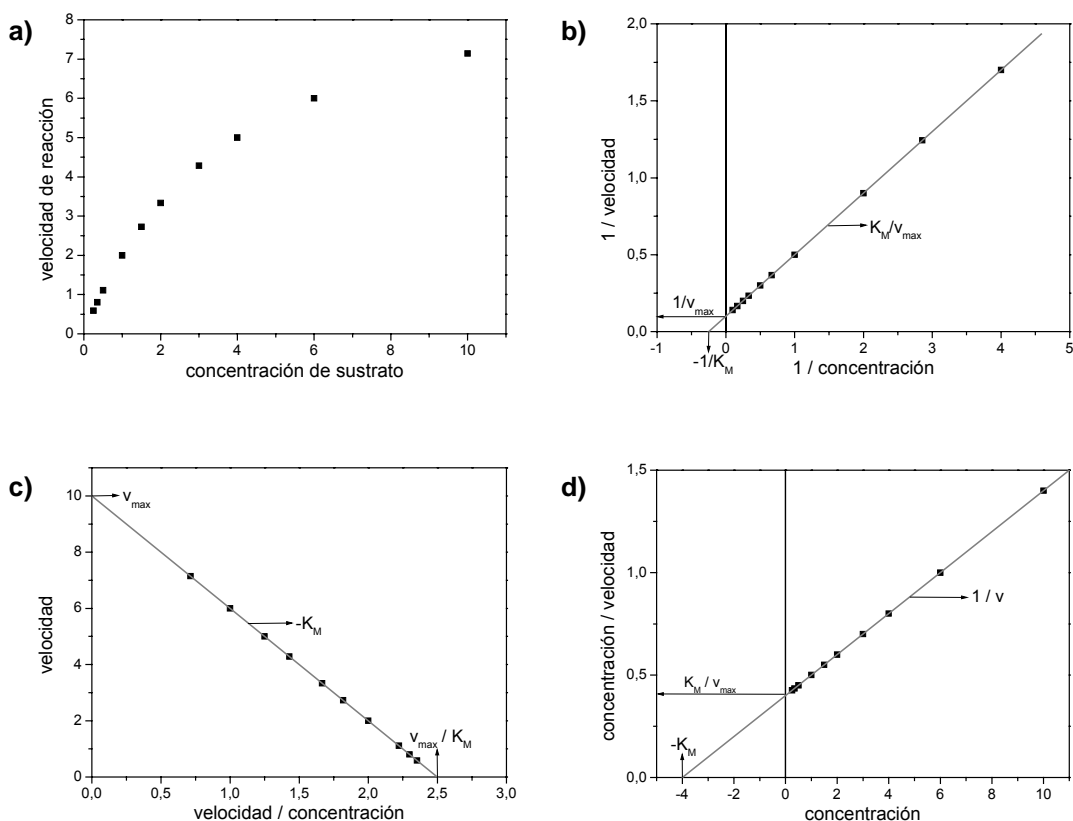


Figura 1.11. Determinación de las constantes cinéticas de una enzima. **a)** variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato. **b)** representación de Lineweaver-Burk. **c)** representación de Eadi-Hofstee. **d)** representación de Hanes.

Representación de Eadi-Hofstee

Esta representación expresa la ecuación de Michaelis-Menten en la forma

$$v = -K_M \cdot \frac{v}{C} + v_{max} \quad (\text{ecuación 1.3})$$

obteniendo así una representación lineal al representar la velocidad frente a la velocidad dividida por la concentración de sustrato (figura 1.11.c). En este caso se obtiene la K_M directamente de la pendiente, mientras que la v_{max} corresponde con la ordenada en el origen.

Con esta representación todos los puntos tienen el mismo peso en la regresión lineal, evitando el problema de la representación de Lineweaver-Burk. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la velocidad de reacción es un valor medido experimentalmente, con un error experimental asociado que se representará en ambos ejes. Aún así, los valores obtenidos son mejores que en el caso de la representación de Lineweaver-Burk.

Representación de Hanes

Es otra representación lineal obtenida a partir de la ecuación de Michaelis-Menten. En este caso,

$$\frac{C}{v} = \frac{C}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \quad (\text{ecuación 1.4})$$

En esta representación K_M se obtiene por el corte con el eje horizontal y v_{\max} a partir de la pendiente (figura 1.11.d).

En este caso todos los puntos tienen el mismo peso en la regresión lineal y la velocidad de reacción sólo esta presente en uno de los ejes, con lo que se solucionan los problemas asociados a las otras representaciones.

2- OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis ha sido desarrollar y caracterizar un electrodo enzimático con el fin de usarlo como biocátodo en una pila de combustible. Para ello se ha elegido una lacasa, la aislada del hongo *Trametes hirsuta*, debido a su capacidad de reducir O_2 a H_2O a alto potencial redox, lo que ofrecerá la posibilidad de obtener un mayor voltaje en la biopila de combustible. Como electrodos soporte del enzima se han utilizado diferentes superficies de carbono y de oro, con el fin de determinar la más adecuada para la electroreducción catalítica de oxígeno. Así mismo dichas superficies se han funcionalizado con distintas monocapas para favorecer la orientación y unión covalente de la lacasa a la superficie.

Para cumplir el objetivo principal se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Caracterización de las propiedades catalíticas de la lacasa de *Trametes hirsuta*, con especial atención al cálculo de las constantes cinéticas respecto al O_2 .
- Caracterización de diferentes superficies de carbono y oro, tanto desnudas como funcionalizadas con monocapas de moléculas orgánicas.
- Optimización de la inmovilización de la enzima lacasa sobre los electrodos funcionalizados, prestando especial interés a su orientación.
- Optimización de las condiciones de reducción catalítica de oxígeno por parte de la lacasa unida covalentemente a las superficies de carbono, particularmente la estabilidad operacional y su respuesta a la presencia de inhibidores.
- Diseño y caracterización de una biopila de combustible enzimática basada en la transferencia electrónica directa entre enzimas y electrodos.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Enzima lacasa

En la presente tesis se han utilizado dos lotes de lacasa de *Trametes hirsuta*, ambos proporcionados por el Dr. S. Shleev (*Malmö University*, Malmö, Sweden). La lacasa fue crecida y purificada como Shleev y cols. describen en su trabajo⁹¹ por M. Gorbacheva (*Bakh Institute of Biochemistry*, Moscú, Rusia).

Las disoluciones madre de lacasa, preparadas en tampón fosfato 100 mM pH 6,5, se guardaron alícuotadas a -20 °C. Un día antes de su uso, las alícuotas se descongelaron y se almacenaron a 4 °C para permitir la reoxidación de las lacasas que se hubieran autoreducido durante el almacenamiento a baja temperatura⁹⁰.

3.1.2. Reactivos

4-nitrobencenodiazonio tetrafluoroborate, 97% (Sigma-Aldrich), guardado bajo atmósfera de nitrógeno.

Nitrito sodico, 99,99+% (Sigma-Aldrich)

2-nitro-4-aminofenol, 99% (Acros Organics)

Cistamina dihidrocloruro (Sigma-Aldrich)

2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)

3-mercapto-1-propanol, 95% (Sigma-Aldrich)

6-mercapto-1-hexanol, 97% (Sigma-Aldrich)

4-aminotiofenol (Sigma-Aldrich)

Difenil-4,4'-ditiol, 95% (Sigma-Aldrich), guardado a -20°C en atmósfera de argon.

EDC, 1-(3-dimetilaminopropyl)-3-etilcarbodiimida hidroc loruro (Sigma-Aldrich), alícuotada y guardada a -20°C.

NHS, N-hydroxisuccinimide, >97,0% (Fluka)

Periodato sodico (Panreac)

Glutaraldehido, 25% (Fluka)

Catecol, 99% (Sigma-Aldrich)

ABTS, 2,2'-azinobis-(3-ethylbencentiazoline-6-sulfonato) sal de diamonio, 98% (Sigma-Aldrich)

Ferricianuro potásico, 99% (Sigma-Aldrich)

Ferrocianuro potásico, 99% (Sigma-Aldrich)
Fluoruro sódico, 97% (Sigma-Aldrich)
Cloruro sódico, 98% (Panreac)
Cloruro potásico, 99% (Panreac)
Tetrabutylamonio tetrafluoroborato (Bu_4NBF_4 , Sigma-Aldrich)
Perclorato sodico, 98% (Sigma-Aldrich)
Acetato sódico trihidratado (Fluka)
Ácido acético, 99% (Prolabo)
Ácido cítrico (Sigma-Aldrich)
Hidrógeno fosfato disódico 12-hidrato (Panreac)
di-hidrógeno fosfato sódico 2-hidrato (Panreac)
Ácido ortofosfórico (Merck)
Ácido sulfúrico, 96% (Panreac)
Hidróxido potásico, 98% (Panreac)
Etanol, 99,5% (Panreac)
Acetonitrilo (Panreac)
Tamiz molecular de aluminio-silicato sódico, 1/16 pulgadas, diámetro de poro nominal 4 Å (Sigma-Aldrich)
Pasta coloidal de alúmina, tamaño de poro 1,0, 0,3 y 0,05 μm (Buheler)
BIO-RAD *protein assay* (Bio-Rad)
BSA, albúmina de suero bovino, 99% (Sigma-Aldrich)
Glucosa, 99 % (Sigma-Aldrich)
Lactosa, 95 % (Sigma-Aldrich)
Celobiosa, 98 % (Sigma-Aldrich)
 O_2 , Alphagaz 1 (Air liquid)
 N_2 de alta pureza producido en el ICP por descomposición de aire.
Ar, Alphagaz 2, con un contenido de $\text{O}_2 < 0.1$ ppm (Air liquid). Tanto el nitrógeno como el argon se pasaron por un filtro de O_2 (Varian) para eliminar las trazas antes de borbotearlos en la disolución de medida.

3.1.3. Disoluciones

Todas las disoluciones se realizaron usando agua desionizada Milli-Q (18,2 Ω). La preparación de los tampones se realizó mezclando disoluciones de la misma concentración de las formas ácida y básica para obtener el pH adecuado.

3.1.4. Instrumentación analítica

Espectrofotómetro UV-visible Uvikon 940 (Kontron Instruments).

Analizador de adsorción de gas ASAP 2010 (Micromeritics)

Porosímetro de Hg Poresizer 9320 (Micromeritics)

Potenciostatos: BAS CV 50W (Bioanalytical Systems), PGSTAT 10 y PGSTAT 12 (Autolab) controlados por software GPES.

Espectrómetro de masas cuadrupolar Masstor 200 DX, VG quadrupoles Ltd.

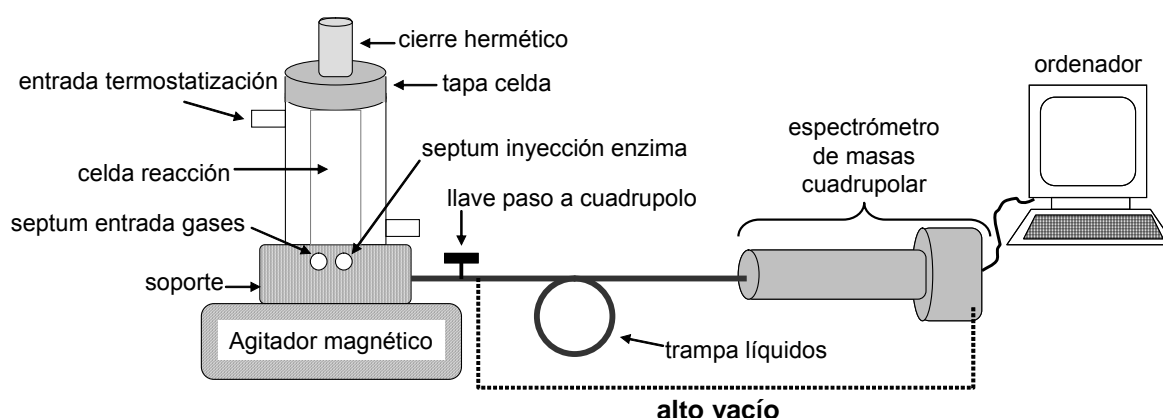


Figura 3.1. Esquema del espectrómetro de masas usado para la medida de las constantes cinéticas de la enzima.

En la figura 3.1 se muestra un esquema del equipo que consta de una celda de reacción de 10 ml, termostatizada y herméticamente cerrada, con dos septum por los que se puede inyectar enzima o gas en la disolución. La celda se sitúa sobre un agitador magnético para permitir la homogenización de la disolución por agitación. En el fondo, protegida por una rejilla de teflón, se encuentra una membrana de teflón, de 13 μm de espesor, permeable a gases. La membrana se encuentra conectada a una trampa de líquidos sumergida en nitrógeno líquido, cuya misión es retener las partículas de agua que pudieran pasar y saturar el filamento. A continuación se encuentra el espectrómetro, donde primero se ioniza la muestra gaseosa por bombardeo de electrones, emitidos por un filamento de wolframio en el cual se aplica un elevado campo eléctrico. Posteriormente, los iones se separan en función de su relación masa/carga en el cuádruplo, dónde se aplican corrientes continua y alterna adecuadas para la separación de los iones. Por último, los iones que tienen una relación carga/masa determinada llegan al detector (de Copa de Faraday o multiplicador de electrones), donde se registra, en forma de potencial, la respuesta proporcional a la presión parcial del gas deseado en

la celda. El cuádruplo, así como todo el circuito que conecta la celda con él, se encuentra en alto vacío ($\sim 10^{-9}$ bar).

3.1.5. Material electroquímico

3.1.5.1. Electroodos

Electrodo de referencia: la mayoría de las medidas se realizaron usando un electrodo de Ag|AgCl|3 M KCl (BAS) como electrodo de referencia. Las medidas de los electrodos de oro tridimensionales y del biocátodo de la pila de combustible se realizaron usando como referencia un electrodo de calomelanos saturado, Hg|HgCl₂|KCl_{sat}. Sin embargo, excepto si se especifica otra cosa, todos los potenciales del presente trabajo se dan respecto al Ag|AgCl|3 M KCl (200 mV vs. ENH).

Contra electrodo: hilo de platino de 0,50 mm de diámetro y pureza del 99,99% (Goodfellow). Para las medidas de los electrodos de oro tridimensionales se utilizó una red de platino (Goodfellow) para asegurar que la superficie del contraelectrodo fuera superior a la del electrodo de trabajo.

Electrodos de trabajo:

- Electrodo de disco de oro de 1,6 mm de diámetro con soporte de teflón (BAS).
- Electroodos de oro tridimensionales (3D PSi): electrodos de oro de oro de alta porosidad proporcionados por el Dr. Anton Ressine (*Department of Physics, University of Aarhus*, Dinamarca). Fueron fabricados recubriendo, mediante bombardeo con plasma de argón, láminas de silicio poroso, de área geométrica 0,36 cm², con una capa de oro de 10 o 40 nm de espesor.
- Nanopartículas de oro: proporcionadas por el Dr. José María Abad (*Chemistry Department, University of Liverpool*, Reino Unido). Nanopartículas con un diámetro de 13 nm recubiertas con una monocapa de citrato.
- Carbono vitrificado (GC): electrodo de disco de carbono vitrificado de 3,0 mm de diámetro con soporte de teflón (BAS).
- Grafito pirolítico (PG): electrodo de disco de grafito pirolítico (plano edge) de 5,0 mm de diámetro con soporte de teflón (PINE).
- Grafito de baja densidad (LDG): barra de grafito de baja densidad de 3,0 mm de diámetro y 99,999% de pureza (Sigma-Aldrich).
- Grafito espectroscópico (SPG): barra de grafito espectroscópico de 3,0 mm de diámetro (tipo RW001, Ringsdorff Werke).

Los electrodos de trabajo LDG y SPG fueron recubiertos con teflón previo a su uso en electroquímica para aislar los laterales de la barra de carbono y obtener una superficie circular de trabajo de 3,0 mm de diámetro. Para los experimentos realizados con rotación, las barras de grafito se montaron sobre un adaptador de teflón, fijándolas con araldite.

3.1.5.2. Celda electroquímica

Las medidas electroquímicas (voltamperometría cíclica, cronoamperometría y cronoculombimetría) de los electrodos de carbono se realizaron usando celdas de vidrio termostatzadas de 15 ml de volumen, con una tapa de teflón adaptada para la colocación de los diferentes electrodos (electrodo de trabajo, electrodo de referencia y contraelectrodo), el sistema de borboteo de gas en la disolución y la adición de reactivos en la celda. El nitrógeno y el argón borboteados fueron pasados previamente por filtros de O₂ de Varian para la eliminación de trazas. Los electrodos de oro y la biopila de combustible se midieron en celdas de entre 20 y 50 ml de volumen.

3.1.6. Otros aparatos

Rotor de electrodos MSR (PINE) controlado por una unidad MSRX (PINE).

Agitador magnético RET y RCT basic (IKA)

Baño termostatzado Tectron (P-selectra)

Baño de ultrasonidos (P-selecta)

pH metro pH meter 691 (Metrohm), calibrado diariamente con disoluciones estándar de pH 7,0 y pH 4,0.

Agitador vortex MSE (microcentaur)

Bomba de alto vacío Pirani penning 1005 (Edwards)

Cámara anaerobia Mbraum (Unilab)

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterización de las enzimas

3.2.1.1. Medida de la concentración de enzima

La concentración de enzima se midió de forma espectrofotométrica según el ensayo “*Bio-Rad Protein Assay*” basado en el método de Bradford²⁰. Este método se

basa en el cambio de color, de rojo a azul, que se produce cuando el reactivo BIO-RAD interactúa con proteínas. El aumento de absorción a 595 nm es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra y puede ser medido mediante un espectro de absorción a 595 nm.

Para la utilización de éste método con fines cuantitativos es preciso un calibrado. La recta de calibrado se realizó utilizando la proteína BSA en tampón fosfato 5 mM a pH 7,5. Se usaron cubetas espectroscópicas de 1 ml de volumen y un paso de luz de 1 cm. El reactivo BIO-RAD se añadió en último lugar, llevando a cabo la medida cinco minutos después de su adición. Todas las medidas se corrigieron mediante la sustracción de un blanco sin BSA.

Para la medida de la concentración de enzima lacasa fue preciso diluir la disolución madre 100 veces en tampón fosfato 5 mM pH 7,5. La medida de absorbancia se realizó de la misma manera que para la BSA, utilizando al menos dos volúmenes diferentes de lacasa diluida. Las medidas se corrigieron mediante la sustracción de un blanco sin enzima. La concentración de la disolución madre de lacasa se calculó por interpolación en la recta de calibrado, tomando el valor medio entre las dos medidas.

3.2.1.2. Medida de la actividad enzimática

La actividad enzimática de la lacasa se calculó espectrofotométricamente usando como sustrato ABTS. Como se ha comentado en la introducción, la oxidación enzimática de ABTS produce un catión radical, $ABTS^{+}$, que presenta un máximo de adsorción a 405 nm con un coeficiente de absorción de $36,8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²⁵.

El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente en tampón acetato 50 mM NaClO_4 100 mM a pH 4,2. Se añadieron 10 μl de lacasa diluida 1000 veces sobre 1 ml de ABTS 1 mM, midiendo inmediatamente la absorción de la mezcla a 405 nm durante 3 minutos. A partir de la pendiente de la recta obtenida se calculó la actividad de la enzima de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Actividad[U / ml] = \frac{pte \cdot V_{total} \cdot CoeficienteDilución}{36,8 \cdot V_{enzima}} \quad (\text{ecuación 3.1})$$

en la que una unidad (U) corresponde a $1 \mu\text{mol}$ de ABTS min^{-1} .

Conociendo la concentración de enzima se calculó la actividad específica en U/mg.

3.2.1.3. Cálculo de las constantes cinéticas

La constante de Michaelis de la enzima lacasa respecto al oxígeno ($K_M^{O_2}$) se calculó utilizando el espectrómetro de masas cuadrupolar descrito anteriormente (figura 3.1).

Antes de usar el espectrofotómetro de masas cuadrupolar es preciso limpiar la trampa de líquidos de partículas que pudieran haberse quedado en ella. Para ello se calienta la trampa, por aplicación de aire caliente, manteniendo la misma conectada a una bomba de vacío. Una vez limpia la trampa se deja enfriar y se sumerge en nitrógeno líquido. Para asegurar una temperatura homogénea en toda la trampa esta operación se realizó unos 30 minutos antes de la medida.

Todas las medidas se realizaron usando tampón acetato 10 mM pH 4,5 con una concentración 3 mM de ABTS a una temperatura de 27 °C y presión atmosférica. La corriente aplicada en el cuádruplo fue aquella que permitió la obtención de la máxima señal en el detector multiplicador de electrones para la medida a masa 16.

El calibrado de la respuesta del detector a la concentración de oxígeno en la celda se realizó a partir de una disolución desgaseada con argón ($C^{O_2} = 0$ mM) y una disolución saturada en oxígeno ($C^{O_2} \approx 1,2$ mM, calculada para cada día en función de la presión atmosférica). La validez de la recta se probó midiendo la respuesta obtenida para una disolución saturada en aire ($C^{O_2} \approx 0,2$ mM, según presión atmosférica) y para concentraciones menores de oxígeno, obtenidas mediante inyección en la celda de reacción de volúmenes fijos de disolución saturada en oxígeno.

Las medidas de consumo de oxígeno por parte de la lacasa se calcularon mediante la medida en continuo de la señal obtenida en el detector. Para ello se partió de disoluciones con distintas concentraciones de oxígeno, obtenidas por borboteo de oxígeno durante diferentes tiempos para las de alta concentración, y por inyección de volúmenes de disolución saturada para las de baja concentración. Durante el primer minuto se registró la variación de la señal en función del tiempo debida al autoconsumo del sistema. Posteriormente se procedió a la adición de un volumen determinado de lacasa en el medio, registrándose un cambio en la pendiente del registro cuyo valor, una vez corregido el valor del autoconsumo, se corresponde al consumo de oxígeno de la lacasa en función del tiempo, esto es, a la velocidad de reacción o actividad del enzima respecto al oxígeno.

El valor de la K_M^O y el valor de la velocidad máxima de reacción (v_{max}) se calcularon a partir de las distintas representaciones descritas en la introducción. Conociendo el valor de v_{max} y considerando el peso molecular de la lacasa (~70000 kDa) se obtuvo el número de recambio o la constante catalítica (k_{cat}) de la lacasa respecto al oxígeno.

3.2.2. Pretratamiento de los electrodos

Los electrodos de oro se limpiaron mediante 20 ciclos de reducción electroquímica en KOH 0,5 M, entre -200 mV y -1400 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl a una velocidad de barrido de 100 mV s⁻¹. A continuación los electrodos fueron tratados con disolución piraña (1:3 de H₂O₂:H₂SO₄) recién preparada durante 10 minutos. *Esta disolución debe ser manejada bajo estrictas normas de seguridad debido a su alto poder corrosivo y la alta temperatura que alcanza.* Posteriormente se pulieron con pasta de alúmina 0,1 µm y 0,05 µm sonicándose en agua durante 10 minutos para eliminar las partículas de alúmina de la superficie. Finalmente se realizó una limpieza oxidativa de 20 ciclos en H₂SO₄ 0,5 M entre 0 mV y 1700 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl a una velocidad de barrido de 100 mV s⁻¹. Los electrodos así tratados, se guardaron en H₂SO₄ 0,5 M. Antes de su uso se lavaron con agua y se secaron.

Los electrodos GC y PG primero se pulieron con una lija fina, para eliminar los restos de la monocapa unida covalentemente a la superficie, y posteriormente se pulieron con pasta de alúmina 0,1 µm y 0,05 µm, para obtener una superficie lisa. Por último se sonicaron en agua durante 10 minutos para eliminar las partículas de alúmina de la superficie. Los electrodos de SPG y LDG se pulieron con lija, sonicándose después en agua durante 10 minutos.

3.2.3. Caracterización electroquímica de los electrodos base

Las superficies no son perfectamente planas sino que presentan cierta rugosidad de forma que, a nivel microscópico, el área que presentan es superior al área visible o geométrica. Esta distinción cobra importancia en electroquímica, puesto que el área electroactiva de los electrodos puede variar según el modo de trabajo. Así, cuando se trabaja en condiciones de control por difusión lineal (por ejemplo, voltamperometría cíclica) la rugosidad de los electrodos es despreciable frente al espesor de la capa difusional, por lo que podemos considerar los electrodos como superficies planas y su área electroactiva será comparable al área geométrica. Por otro lado, cuando se trabaja

en condiciones en que no se dan condiciones de control por difusión lineal (por ejemplo, sustancias adsorbidas sobre el electrodo), se debe considerar el área microscópica del electrodo, que considera la rugosidad del mismo.

3.2.3.1. Área geométrica

Tanto para los electrodos de oro como para los de grafito, el área geométrica se calculó mediante voltamperometría cíclica (VC) usando como sonda electroactiva ferricianuro potásico, puesto que presenta una electroquímica monoelectrónica reversible y su coeficiente de difusión es conocido ($D = 7,78 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

Las medidas se realizaron en una disolución 0,1 M de KCl a pH 5,0 conteniendo una concentración 1,0 mM de ferricianuro potásico. El potencial del electrodo se barrió entre 600 y 0 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl a 25 mV s^{-1} hasta obtener un VC constante.

El área se calculó a partir del pico catódico del VC (figura 3.2) usando la ecuación de Randles-Sevcik, que, a 25°C es¹²,

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C_\infty v^{1/2} \quad (\text{ecuación 3.2})$$

donde i_p es la corriente de pico (A), n es el número de electrones transferidos en el proceso, A es el área electroactiva del electrodo (cm^2), D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), C_∞ es la concentración en disolución de la especie (mol cm^{-3}), y v es la velocidad de barrido de potencial (V s^{-1}).

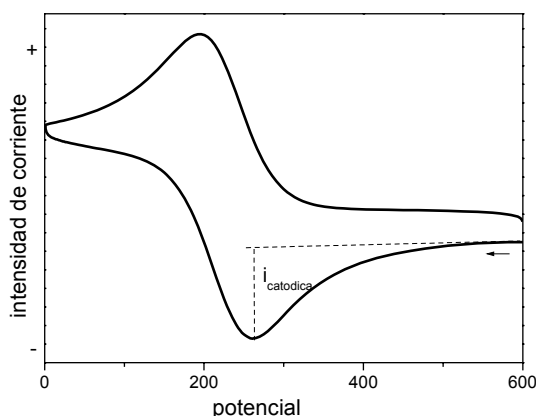


Figura 3.2. VC del ferricianuro en un electrodo de carbono.

3.2.3.2. Área microscópica

En el caso de electrodos de oro, el área microscópica se calculó barriendo el potencial del electrodo entre -200 y +1700 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl en H_2SO_4 0,5 M hasta obtener un VC constante. Para el cálculo se integró el pico de reducción obtenido

a unos 900 mV, que esta asociado a la desorción de una monocapa completa de oxido de oro (Au_2O_3) (figura 3.3). La concentración de átomos de oro superficial depende del plano que se encuentre expuesto, puesto que no presentan la misma concentración un plano (111) que un plano (110). Cuando se trata de oro policristalino es difícil determinar el porcentaje de cada plano que se encuentra expuesto, por lo que se puede usar una concentración media basada en la densidad del oro (19.3 g cm^{-3} , oro puro), su peso atómico ($196.967 \text{ g mol}^{-1}$) y un espesor correspondiente al diámetro atómico (2.6 \AA). De esta forma se establece que, para la oxidación completa de la superficie de oro, es necesaria una carga de $723 \mu\text{C cm}^{-2}$.

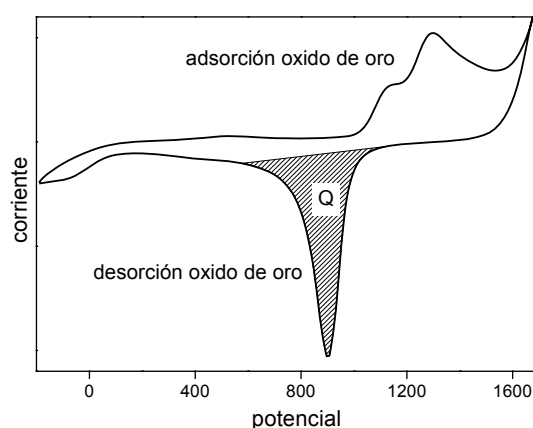


Figura 3.3. VC del oro en medio ácido.

Para los electrodos de grafito el área microscópica se calculó mediante cronoculombimetría (CC), una técnica en la que se aplica un pulso de potencial entre un potencial inicial (E_1), en el que no hay electrólisis de la especie electroactiva, para pasar de forma instantánea a un potencial (E_2), en el que ocurre la reducción u oxidación completa de la especie, y, tras un corto periodo de tiempo (ms), volver al potencial inicial, oxidando o reduciendo de nuevo la especie. Durante todo el experimento se registra la carga total requerida en función del tiempo (figura 3.4.a). Puesto que el registro se hace en un periodo de tiempo muy corto, el espesor de la capa difusional es del mismo orden que la rugosidad del electrodo, y por tanto la carga depende del área microscópica.

Experimentalmente las medidas se realizaron en una disolución 1,0 mM de ferricianuro potásico en KCl 0,1 M a pH 5,0, aplicando un pulso de potencial de 250 ms, entre un potencial inicial de 600 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl, en el que no ocurre la reducción de la especie, y un potencial final de 0 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl, en el que el ferricianuro se encuentra totalmente reducido (figura 3.2). Para cada potencial se

representó la carga total frente a la raíz del tiempo, obteniendo una gráfica conocida como la representación de Anson (figura 3.4.b), que se describe según la ecuación¹²:

$$Q = \frac{2 \cdot n \cdot F \cdot A \cdot C \cdot D_0^{1/2} \cdot t^{1/2}}{\pi^{1/2}} + Q_{dl} + n \cdot F \cdot A \cdot \Gamma_0 \quad (\text{ecuación 3.3})$$

donde, Q es la carga (C), n es el número de electrones intercambiados en el proceso, F es la constante de Faraday (96480 C mol⁻¹), A es el área del electrodo (cm²), C es la concentración de especie electroactiva (mol cm⁻³), D_0 es el coeficiente de difusión de la especie (cm² s⁻¹), t es el tiempo, Q_{dl} es la carga capacitativa, y Γ_0 es el exceso de reactivo en la superficie.

A partir de la pendiente obtenida ajustando a una línea recta los datos de carga obtenidos para la reoxidación de la especie (600 mV), se calculó el área microscópica del electrodo, puesto que para el ferricianuro $n=1$ y $D_0 = 7,78 \cdot 10^{-2}$ cm² s⁻¹

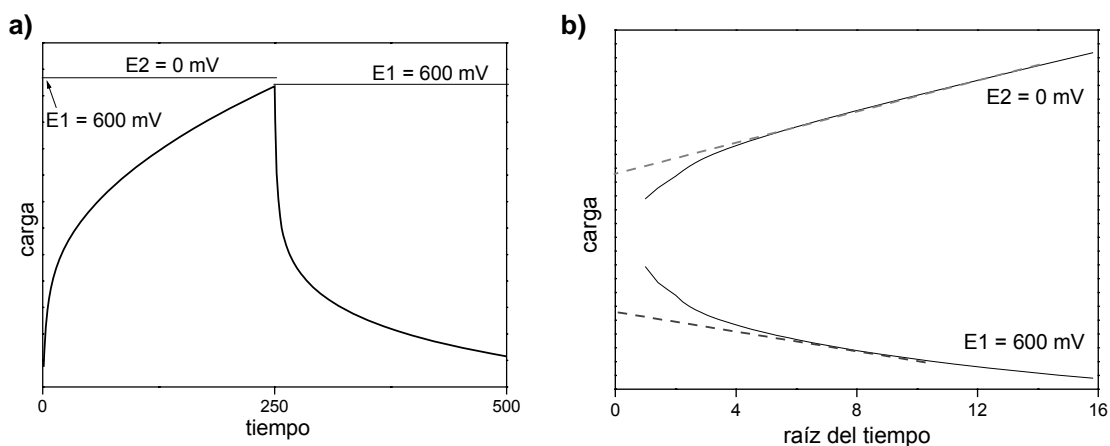


Figura 3.4. a) CC de ferricianuro. **b)** Representación de Anson del CC del apartado a.

3.2.4. Distribución del tamaño de poro

Cuando los electrodos se utilizan como soportes de enzimas, es importante considerar el tamaño de los poros en relación con el tamaño de la proteína, puesto que si el poro es demasiado pequeño la proteína no podrá acceder a él. Por otro lado, en un tamaño adecuado de poro la proteína puede adsorberse fuertemente, su estructura se puede estabilizar e incluso se puede favorecer la transferencia electrónica directa con el electrodo¹⁷.

En la presente tesis se han utilizado dos metodologías para abarcar todo el rango de tamaños de poros: isothermas de adsorción de nitrógeno (para el estudio de microporos) y porosimetría de intrusión de mercurio (para el estudio de macroporos).

Para los estudios se prepararon discos de aproximadamente 3 mm de espesor de los electrodos LDG y SPG (diámetro 3 mm), puliendo ambos lados con papel de lija. Previo a su uso los discos se desgasearon a 110°C durante 2 horas en vacío para eliminar las moléculas adsorbidas en la superficie. Las isotermas de adsorción de N₂ se registraron a 77 K midiendo el volumen de gas adsorbido en función de la presión aplicada. La porosimetría de intrusión de Hg se registró a 21°C midiendo el volumen de mercurio que penetra en el sólido en función de la presión aplicada.

3.2.5. Funcionalización de los electrodos de oro

Monocapas autoensambladas (SAMs)

Los electrodos de oro se modificaron mediante la formación de SAMs de grupos tioles por inmersión de los electrodos en disoluciones de diferentes compuestos o mezcla de compuestos. La concentración y el tiempo de reacción usados para la formación de cada monocapa se detallan en el apartado 4.3 de Resultados y Discusión. Previo a su utilización, el electrodo funcionalizado con la SAM se lavó en etanol:agua 1:1 con agitación durante diez minutos.

Nanopartículas de oro

La funcionalización de los electrodos de disco con nanopartículas de oro se realizó mediante el proceso representado en la figura 3.5. En un primer paso el electrodo de disco de oro se incubó en 1 mM de bifenil-4,4-ditiol en etanol durante 24 horas. Posteriormente el electrodo se lavó con agitación en etanol durante 10 minutos para eliminar los restos de ditiol no quimisorbido. Tras secar el electrodo se depositó una gota de 10 µl de nanopartículas de 13 nm de diámetro, cubriendo el electrodo con un eppendorf para evitar la evaporación, y se dejó reaccionar durante 24 horas. Finalmente el electrodo se lavó en agua durante 10 minutos con agitación para eliminar los restos de nanopartículas no quimisorbidas a la monocapa.

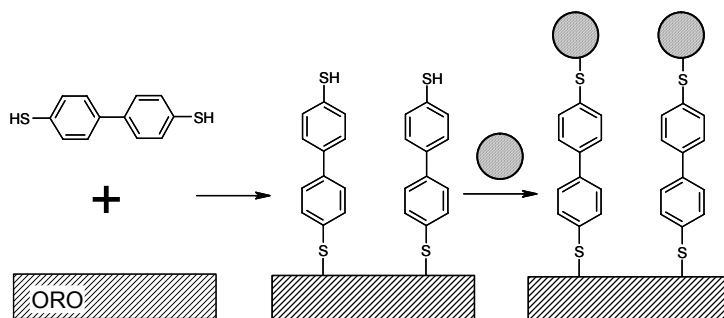


Figura 3.5. Funcionalización de la superficie de oro con nanopartículas de oro.

3.2.6. Funcionalización de los electrodos de carbono

3.2.6.1. Monocapa de aminofenilos

El procedimiento de modificación se basa en el desarrollado por el grupo de Pinson y Saevant^{3, 32} de funcionalización electroquímica de electrodos de carbono a partir de sales de diazonio. Los pasos del proceso pueden verse en la figura 3.6.a. En un primer paso los potenciales de los electrodos fueron barridos dos veces entre 750 y -50 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl a 200 mV s⁻¹, en una disolución 2 mM de sal de diazonio de 4-nitrobenceno preparada en CH₃CN anhidro, conteniendo Bu₄NBF₄ en concentración 0,1 M. De esta manera se obtiene una monocapa de nitrofenilos covalentemente unida, a través de un enlace C-C, a la superficie de carbono. Para la reducción de los grupos nitro a amino el electrodo se transfirió a una disolución desoxigenada 1:9 de EtOH:H₂O, conteniendo KCl en concentración 0,1 M, y se realizaron dos ciclos reductivos, entre 0 y -1400 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl a 10 mV s⁻¹. La reducción de los grupos nitro a aminos no es completa obteniéndose de esta forma una monocapa mixta de aminofenilos e hidoxilaminofenilos²¹.

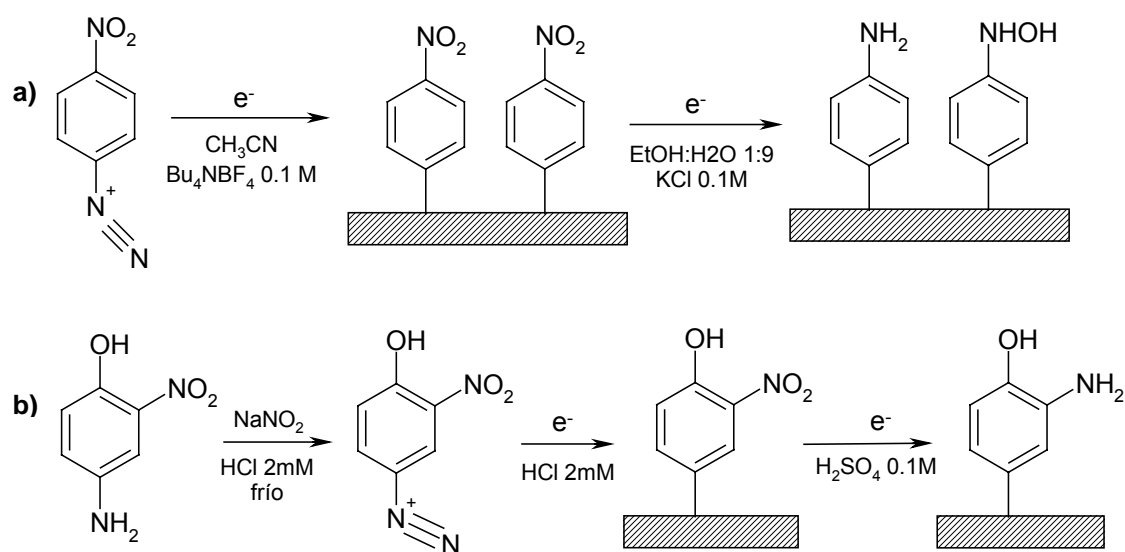


Figura 3.6. a) Funcionalización de la superficie de grafito con una monocapa de aminofenilos. b) Funcionalización de la superficie de grafito con una monocapa de aminofenoles.

3.2.6.2. Monocapa de aminofenoles

El procedimiento se basa en el método descrito por Nassef y cols⁷⁴. Los pasos del proceso pueden verse en la figura 3.6.b. El primer paso consistió en la formación de

una sal de diazonio, mediante reacción química por adición de 1 ml de nitrito sódico 90 mM sobre 3 ml de una disolución 30 mM de 2-nitro-4-aminofenol previamente enfriada en un baño de hielo. Ambos reactivos se prepararon en HCl 2 mM, siendo preciso para disolver el 2-nitro-4-aminofenol sonicar durante 2 minutos. La mezcla se dejó reaccionar durante 1 hora, manteniendo la agitación y el baño de hielo.

Los electrodos se modificaron con la sal de diazonio de 2-nitrofenol generada mediante voltamperometría cíclica (10 ciclos, 100 mV s^{-1} , entre 600 y 0 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl) en la propia mezcla de reactivos, obteniendo una monocapa de 2-nitrofenoles. La reducción de los grupos nitro en este caso se llevó a cabo mediante reducción electroquímica (10 ciclos, 50 mV s^{-1} , entre 0 y -850 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl) en una disolución desoxigenada de H_2SO_4 0,1 M obteniendo como resultado una monocapa de 2-aminofenoles^{58, 96}.

3.2.7. Inmovilización de enzima lacasa en el electrodo

3.2.7.1. Absorción física

Para la absorción física de la enzima en el electrodo (funcionalizado o desnudo), se colocó una gota de enzima sobre la superficie electródica, tapándolo con un eppendorf para evitar su evaporación. Se dejó reaccionar durante 30 minutos, tras lo cual el electrodo se lavó, primero con un chorro de agua y posteriormente en tampón de medida durante 10 minutos con agitación.

3.2.7.2. Inmovilización covalente

La inmovilización covalente se llevó a cabo en los electrodos modificados con monocapas mediante dos métodos:

a) Formación de enlace amida

Sobre la superficie electródica funcionalizada y seca se colocó un volumen de 70 μl de disolución de lacasa diluida por cm^2 de área geométrica del electrodo. El electrodo se cubrió con un eppendorf, para evitar la evaporación de la gota, y se mantuvo durante 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir la difusión de la enzima en el electrodo y su orientación sobre la monocapa. Posteriormente se añadieron una gota de NHS 20 mM y otra de EDC 40 mM, ambas del mismo volumen y en el mismo tampón de dilución de la lacasa. Este tratamiento resulta en la activación de los grupos carboxílicos presentes en los residuos glutámicos y aspárticos de la lacasa, favoreciendo

su unión covalente a los grupos amino de la monocapa (figura 3.7.a). Para ello se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente, tapando el electrodo para evitar la evaporación. Finalmente el electrodo se lavó durante 10 minutos con agitación en el tampón de medida.

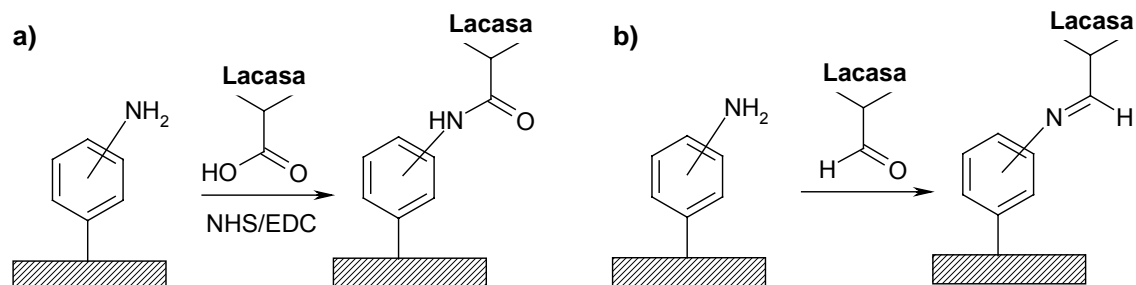


Figura 3.7. Unión covalente de la enzima a las superficies funcionalizadas con grupos amino.

a) enlace amida. **b)** enlace imina o base de Schiff.

b) Formación de enlace imina

Se mezclaron 100 μl de NaIO_4 (10 mg/ml) con 5 μl de disolución madre de lacasa, dejándolo reaccionar durante 30 minutos para que el peryodato oxidara los azúcares de la enzima formando grupos aldehído. Posteriormente el pH se elevó a 7 añadiendo 200 μl de fosfato dibásico 100 mM. En esta disolución se sumergió el electrodo durante una hora a temperatura ambiente. El enlace covalente se forma al reaccionar los grupos aldehídos obtenidos por oxidación de los azúcares de la enzima con los grupos amino de la monocapa, formando un enlace imina o base de Schiff⁴⁴ (figura 3.7.b). Finalmente el electrodo se lavó durante 10 minutos con agitación en el tampón de medida.

3.2.8. Medidas electroquímicas

3.2.8.1. Electrodos funcionalizados con lacasa

Las medidas electroquímicas de los electrodos funcionalizados con enzima se llevaron a cabo en una celda de 15 ml termostatizada a 27 °C. Se usó un electrodo de Ag|AgCl|3 M KCl como referencia y un hilo de platino como contraelectrodo. Para los electrodos de oro tridimensionales se utilizó un electrodo de referencia de calomelanos saturado y una malla de platino como contraelectrodo. El tampón usado, si no se indica otra cosa en el texto, fue acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2.

Las medidas de voltamperometría cíclica (VC) se realizaron entre 900 y -100 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl a 10 mV s^{-1} en disoluciones saturadas en oxígeno o

nitrógeno. En las medidas realizadas con rotación se mantuvo el borboteo de oxígeno directamente en la disolución.

Las medidas de cronoamperometría (CA) se llevaron a cabo, si no se indica otra cosa, a un potencial aplicado de +200 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl, con una agitación magnética suave (100 rpm) y con borboteo continuo de gas en la disolución.

Las medidas de voltamperometría de onda cuadrada (OSWV) se realizaron con una amplitud de 10 mV y a una frecuencia de 10 Hz, desde 900 mV hasta -300 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl a una velocidad de barrido de 50 mV s⁻¹ ⁸⁶.

3.2.8.2. Biopila de combustible

El tampón usado en todas las medidas fue citrato-fosfato 0,1 M pH 4,5 conteniendo en algunos casos una concentración 5 mM de azúcar (glucosa, celobiosa o lactosa). Todas las medidas se realizaron en condiciones de saturación de aire.

Las curvas de polarización se obtuvieron por medidas de voltamperometría a una velocidad de barrido de 1 mV s⁻¹. Para el biocátodo el voltamperograma se registró entre +700 y -200 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl, y para el bioánodo entre -200 y +600 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl.

Los potenciales a circuito abierto se registraron usando un potenciostato AUTOLAB en una configuración de dos electrodos en la que el electrodo de trabajo fue el electrodo modificado con enzima, y como referencia se utilizó un electrodo de Ag|AgCl|3 M KCl o calomelanos. Las medidas se realizaron en condiciones de saturación de aire.

La potencia (*P*) de la biopila de combustible enzimática se calculó como el producto entre el potencial y la intensidad de corriente obtenidos al realizar un voltamperograma entre -800 y 0 mV a 1 mV s⁻¹ en una configuración de dos electrodos en la que el bioánodo se utilizó como electrodo de trabajo y el biocátodo como referencia y contraelectrodo.

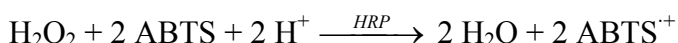
Para el estudio de estabilidad se aplicó una resistencia (*R*) de 1 MΩ entre los electrodos midiendo la variación del voltaje (*V*) en función del tiempo. La potencia de la pila en este caso se calculó teniendo en cuenta la ley de Ohm ($V = I \cdot R$) de forma que

$$P = V \cdot I = \frac{V^2}{R}$$

3.2.9. Detección de agua oxigenada

La detección de agua oxigenada producida por la actividad enzimática de la lacasa inmovilizada en el electrodo se realizó a partir de dos metodologías diferentes:

Espectrofotométricamente⁸⁰: 800 µl de tampón de la celda de medida se mezclaron con 20 µl de enzima peroxidasa HRP (actividad 6000 U ml⁻¹) en una cubeta espectrofotométrica. A continuación se añadieron 200 µl de disolución de ABTS 46 mM y se midió la absorbancia de la mezcla a 405 nm. La absorbancia de la muestra es proporcional a la concentración de ABTS oxidado, que se relaciona con la concentración de agua oxigenada en la celda a través de la reacción química:



dónde las especies ABTS y ABTS⁺ corresponden a las formas reducida y oxidada del ABTS, presentando la forma oxidada absorción a 405 nm ($\epsilon = 36800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Electroquímicamente: utilizando un biosensor electroquímico de agua oxigenada basado en la coinmovilización de HRP y TTF (tetrathiafulvaleno) desarrollado por Campuzano y cols.²⁴. Para la fabricación del biosensor un electrodo de oro previamente pulido se incubó durante 15 horas en MPA 40 mM (en etanol:agua 3:1). Sobre el electrodo funcionalizado se depositó una gota de 2 µl de TTF 0,5 M en acetona, dejándola evaporar. Posteriormente sobre el mismo electrodo se depositaron 2 µl de HRP (tipo II, 160 U mg⁻¹) en tampón fosfato 100 mM pH 7,0. Una vez evaporada la segunda gota, se cubrió el electrodo con una membrana de diálisis, sujetándola con una banda elástica al electrodo. Finalmente el biosensor se guardó en tampón fosfato 100 mM pH 7,0 para la total hidratación de la membrana. La detección de agua oxigenada se realizó mediante cronoamperometría a 0 mV vs. Ag|AgCl|3 M KCl en tampón fosfato 100 mM pH 7,5.

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de la lacasa de *Trametes hirsuta*

4.1.1. Cálculo de la concentración de enzima

La concentración de enzima lacasa se calculó espectrofotométricamente según el ensayo “*Bio-Rad Protein Assay*” basado en el método de Bradford²⁰, tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.1.1 de Materiales y Métodos.

Las distintas concentraciones de albúmina de suero bovina (BSA) precisas para realizar la recta de calibrado se obtuvieron mezclando en la cubeta espectrofotométrica las cantidades de reactivos detalladas en la tabla 4.1.

C _{BSA} (μg ml ⁻¹)	0	1	5	10	15	20
V _{BSA madre} (μl)	0	10	50	100	150	200
V _{tampón} (μl)	800	790	750	700	650	600
V _{BIO-RAD} (μl)	200	200	200	200	200	200

Tabla 4.1. Mezcla de reactivos en la cubeta de reacción para la recta de calibrado. La concentración de disolución madre de BSA es de 100 μg ml⁻¹.

La recta de calibrado se obtuvo a partir de tres series de medidas, realizadas cada una con una disolución madre de BSA independiente (figura 4.1). La ecuación a la que responde dicha recta es:

$$\text{Absorbancia corregida} = (0,01 \pm 0,01) + (0,053 \pm 0,001) * \mu\text{g ml}^{-1} \text{ de proteína}$$

$$R = 0,995$$

La concentración de enzima es la presente en la celda espectroscópica (V = 1 ml).

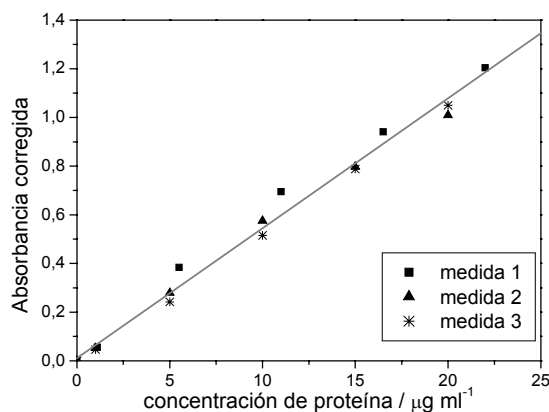


Figura 4.1. Puntos experimentales y ajuste de la recta de calibrado para el cálculo de la concentración de enzima.

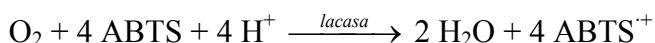
En la tabla 4.2 se recoge la absorbancia de la mezcla, corregida la absorbancia del blanco, cuando se realizó la medida usando diferentes volúmenes de lacasa diluida (100 veces respecto a la disolución madre) en lugar de BSA. Por extrapolación en la recta de calibrado de la figura 4.1 es posible conocer la concentración de lacasa en la cubeta de medida y, considerando las diluciones realizadas, la concentración en la disolución madre de lacasa. En la tabla 4.2 se recogen las concentraciones de disolución madre obtenidas para cada volumen medido, así como la concentración media obtenida para los dos lotes de lacasa *T. hirsuta* usados en el presente trabajo.

	V _{lacasa diluida} μl	Abs corr	C _{madre} μg ml ⁻¹	C _{madre media} μg ml ⁻¹
lote 1	200	0,5484	5,08	4,8 ± 0,4
	100	0,2522	4,57	
lote 2	20	0,1002	9,02	8,9 ± 0,1
	100	0,4532	8,86	

Tabla 4.2. Datos experimentales y concentración de proteína de los lotes de lacasa de *T. hirsuta*.

4.1.2. Cálculo de la actividad enzimática

La actividad específica de la enzima lacasa se calculó espectrofotométricamente usando como mediador ABTS 1 mM. Tal y como se describe en el apartado 3.2.1.2 de materiales y métodos, el ensayo se basa en la reacción catalítica de reducción de oxígeno usando ABTS como sustrato,



siendo posible medir la velocidad de producción del ABTS⁺⁺ debido a que este catión-radical presenta absorbancia en el visible.

Los resultados obtenidos en el cálculo de la actividad enzimática frente al ABTS de los lotes de enzima pueden verse en la tabla 4.3. A partir de la pendiente de oxidación de ABTS⁺⁺ medida, se calculó la actividad enzimática por volumen de disolución de lacasa. Para el cálculo de la actividad específica, se consideraron las concentraciones de los lotes de lacasa recogidos en la tabla 4.2. Como puede apreciarse, el lote 1 presentó una actividad enzimática menor al lote 2.

	Pendiente min^{-1}	Actividad $\text{U}_{\text{ABTS}} / \text{ml}_{\text{lac}}$	Actividad $\text{U}_{\text{ABTS}} / \text{ml}_{\text{lac}}$	Actividad $\text{U}_{\text{ABTS}} / \text{mg}_{\text{lac}}$
lote 1	0,2595	705	770 ± 90	160 ± 19
	0,3065	833		
lote 2	0,8619	2342	2157 ± 262	242 ± 29
	0,7256	1971		

Tabla 4.3. Datos experimentales y actividad enzimática de los lotes de lacasa de *T. hirsuta*. Una unidad (U) corresponde a un μmol de ABTS min^{-1} .

4.1.3. Cálculo de las constantes cinéticas respecto al oxígeno

La mayoría de los trabajos que caracterizan lacasas calculan las constantes cinéticas respecto a diferentes donadores de electrones (ABTS, catecol). Sin embargo, puesto que el objeto del presente trabajo es obtener actividad catalítica de forma directa, prescindiendo del uso de mediadores, se ha considerado más interesante el cálculo de dichas constantes respecto al oxígeno, estando el ABTS en concentración saturante. Aunque las medidas de consumo de oxígeno se suelen realizar usando electrodos de oxígeno de Clark^{41, 97}, en esta tesis se ha optado por realizar las medidas mediante espectrometría de masas, una técnica desarrollada y ampliamente utilizada en el grupo de trabajo para la caracterización de enzima hidrogenasa²³ y que posee una mayor sensibilidad que el electrodo de Clark.

Las medidas se realizaron a masa 16, correspondiente a las masas obtenidas por ruptura de la molécula de oxígeno, puesto que medidas realizadas a masa 32 causaron la saturación del detector, dando como resultado la pérdida de sensibilidad de la señal en pocos minutos.

Antes de cada medida fue preciso realizar un calibrado. Para ello se consideraron dos puntos, uno en que la disolución se encontraba desgaseada con Ar ($\text{C}^{\text{O}_2} = 0 \text{ mM}$) y otra disolución saturada en oxígeno ($\text{C}^{\text{O}_2} \sim 1,2 \text{ mM}$) (figura 4.2.a). Para el cálculo exacto de la concentración de la disolución saturada en oxígeno se consideró cada día la presión atmosférica, teniendo en cuenta que, a una temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y una presión atmosférica de 760 mm Hg , la concentración de saturación de oxígeno en agua es de $1,224 \text{ mM}$. La validez de dicha calibración se comprobó mediante la medida de disoluciones de concentración de oxígeno conocida, como se explica en el apartado

3.2.1.3 de Materiales y Métodos. Dichos puntos se ajustan perfectamente a la recta, como puede verse en la figura 4.2.b.

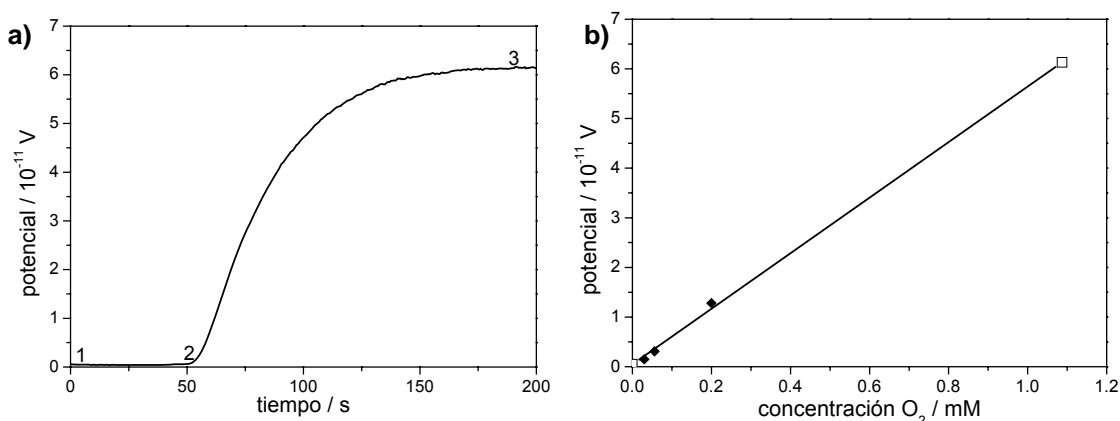


Figura 4.2. Calibrado del espectrómetro de masas. **a)** Respuesta del detector en función del tiempo. A tiempo 1 la disolución se encuentra saturada en Ar. A tiempo 2 se borbotea oxígeno en la celda, hasta alcanzar el punto de saturación de oxígeno (tiempo 3). **b)** Recta de calibrado de la respuesta del detector frente a la concentración de oxígeno. El calibrado se realizó considerando dos puntos, $C_2^O = 0$ mM y saturación de oxígeno (\square). Se comprobó la validez de la recta mediante concentraciones conocidas de oxígeno (\blacklozenge).

Como se explica en el apartado 3.2.1.3 de Materiales y Métodos, las medidas de consumo de oxígeno por parte de la lacasa se obtuvieron mediante la medida en continuo de la señal obtenida en el detector. La figura 4.3 representa un ejemplo de una medida realizada. Partiendo de una disolución saturada en argón ($C_2^O = 0$ mM), se borbotea oxígeno en la disolución hasta alcanzar la concentración de oxígeno deseada, calcula a partir del potencial medido en el detector de acuerdo con el calibrado realizado (figura 4.2.b). Una vez alcanzada la concentración de oxígeno deseada, se cierra la celda herméticamente y se comienza la medida. Durante el primer minuto se mide la pendiente de autoconsumo de la celda. Tras la adición de la lacasa se observa un cambio en la pendiente de la señal obtenida debido al consumo de oxígeno por parte del enzima (figura 4.3). Para el cálculo de la segunda pendiente se consideran sólo los primeros segundos tras la adición de la lacasa, puesto que a tiempos mayores la concentración de oxígeno y de ABTS presentes en la celda ha disminuido debido a la actividad enzimática.

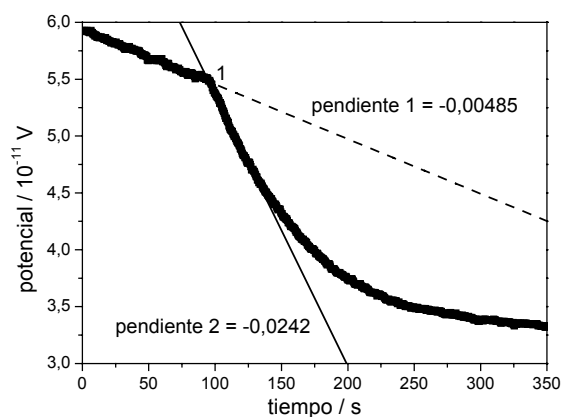


Figura 4.3. Experimento tipo realizado para el cálculo de las constantes cinéticas de la lacasa respecto al oxígeno. La primera pendiente corresponde al autoconsumo de oxígeno. A tiempo 1 se añade lacasa a la celda, obteniendo una segunda pendiente que engloba el autoconsumo y el consumo de oxígeno por parte de la lacasa.

La tabla 4.4 recoge un ejemplo de los datos registrados durante la medida de las constantes cinéticas de la lacasa del lote 1. A partir del potencial medido por el detector del equipo a tiempo 1 se puede calcular la concentración parcial de oxígeno en la celda al inicio de la reacción enzimática, y a partir de la pendiente corregida se puede calcular la actividad enzimática respecto al oxígeno, siendo en ambos casos necesario considerar el calibrado.

Condiciones experimentales		P = 707 mm Hg	T = 25°C	[Lac] = 4,8 mg ml ⁻¹	[ABTS] = 3 mM	
Calibrado del detector		[O ₂] / mM	E / 10 ⁻¹¹ V			
		saturado O ₂	1,140	10,5		
		saturado Ar	0	0,12		
Datos experimentales						
Potencial	[O ₂]	Volumen _{lacasa}	Autocons	Pendiente	Pte corr	Actividad
10 ⁻¹¹ V	mM	μl	10 ⁻¹¹ V s ⁻¹	10 ⁻¹¹ V s ⁻¹	10 ⁻¹¹ V s ⁻¹ μl ⁻¹ _{enz}	μmol O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹
6,62	7,14E-01	4	-6,60E-03	-2,74E-02	-5,19E-03	71,21
5,38	5,78E-01	4	-4,85E-03	-2,42E-02	-4,84E-03	66,40
4,59	4,91E-01	4	-5,48E-03	-2,35E-02	-4,50E-03	61,74
3,81	4,05E-01	4	-5,12E-03	-2,12E-02	-4,03E-03	55,28
3,60	3,82E-01	4	-4,74E-03	-2,00E-02	-3,82E-03	52,47
1,71	1,75E-01	4	-7,88E-04	-0,01095	-2,54E-03	34,87
0,50	4,17E-02	4	-6,05E-05	-4,24E-03	-1,04E-03	14,34

Tabla 4.4. Datos registrados para la medida de las constantes cinéticas de la lacasa (lote 1).

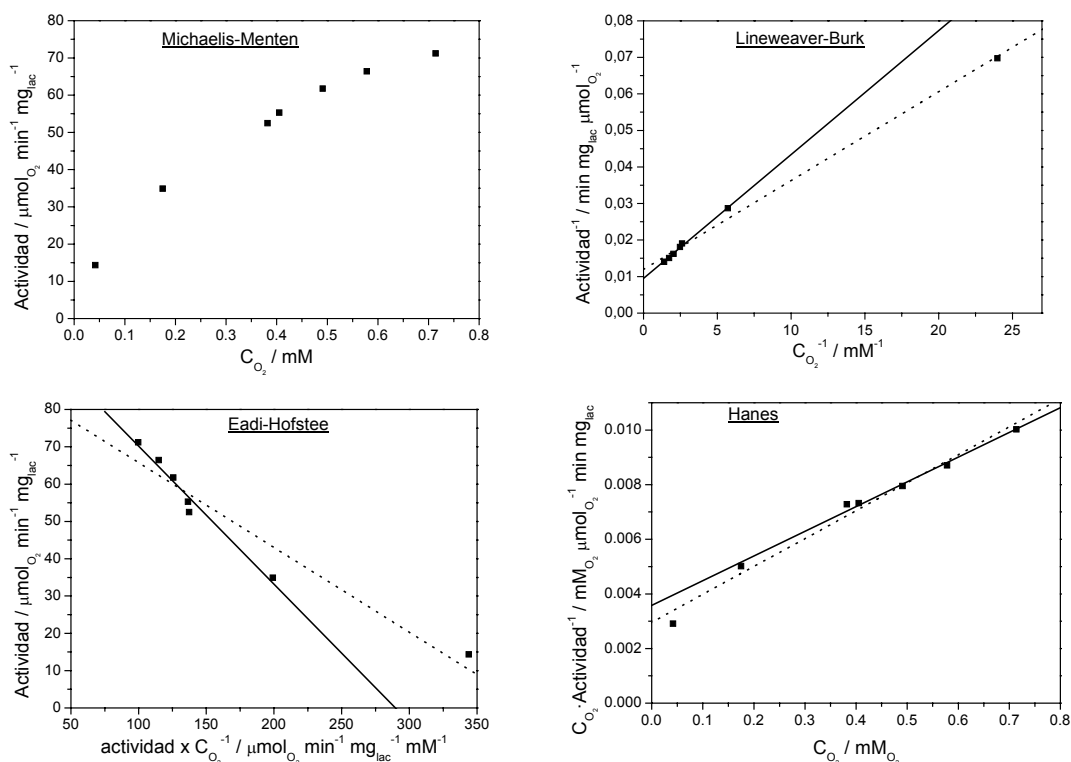


Figura 4.4. Distintas representaciones de los datos de la tabla 4.4. La línea punteada representa el ajuste lineal de los puntos cuando se incluyen todos los puntos experimentales, la línea continua representa el ajuste lineal cuando no se considera el punto obtenido a baja concentración de sustrato.

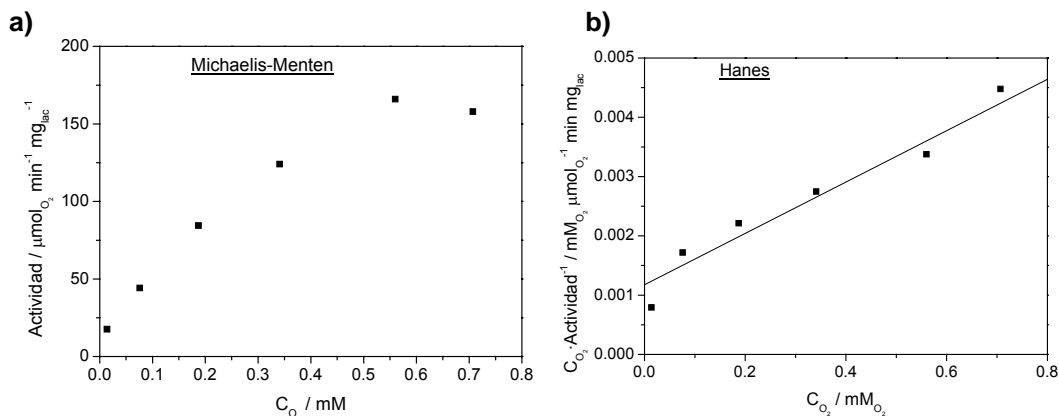


Figura 4.5. a) Datos experimentales para el cálculo de las constantes cinéticas de la lacasa del lote 2. **b)** Representación de Hanes de los datos del apartado a).

Las diferentes representaciones para los datos recogidos en la tabla 4.4 se pueden ver en la figura 4.4. Como se ha comentado en la introducción, las distintas representaciones presentan ciertas diferencias que se reflejarán en el error de los datos que obtendremos. En la figura 4.4 puede verse que en las representaciones de

Lineweaver-Burk (b) y Eadi-Hosftee (c) para obtener un buen ajuste a los datos experimentales es preciso despreciar el punto obtenido a baja concentración de oxígeno, puesto que presenta un mayor error experimental en la medida de la actividad. Sin embargo, en la representación de Hanes (d) dicho error experimental se minimiza, pudiendo usar todos los puntos experimentales para el ajuste lineal con un menor error en el resultado. Un análisis similar se realizó para la lacasa del lote 2, obteniendo las gráficas que pueden verse en la figura 4.5.

En la tabla 4.5 se recogen la constante de Michaelis (K_M^O) y la velocidad máxima (v_{max}) de la lacasa respecto al oxígeno, calculadas a partir de la representación de Hanes. Así mismo, se muestra la constante catalítica o número de recambio (k_{cat}), calculado a partir de la velocidad máxima. Como puede apreciarse, ambas muestras presentan la misma K_M para el oxígeno, con un valor superior a la concentración de oxígeno en disoluciones saturadas en aire, por lo que los experimentos posteriores electroquímicos se realizan en condiciones de saturación de oxígeno. Por otra parte, el número de recambio es mayor para la lacasa del lote 2, lo que está de acuerdo con la mayor actividad específica medida espectrofotométricamente para dicho lote.

	lote 1	lote 2
K_M^O (mM)	$0,32 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,08$
v_{max} ($\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{lacasa}$)	$94,5 \pm 3,5$	298 ± 67
k_{cat} (s^{-1})	110	348

Tabla 4.5. Parámetros cinéticos respecto al oxígeno para los distintos lotes de lacasa de *T. hirsuta*. Los valores son la media aritmética de dos experimentos independientes.

Tanto el valor de K_M como el de k_{cat} obtenidos se correlacionan bien con los reportados en la bibliografía para lacasas de alto potencial respecto al oxígeno. Por ejemplo, Thuesen y cols.⁹⁷ obtuvieron un valor de $K_M = 0,612$ mM para la lacasa de *Poliporous versicolor* adsorbida en grafito; y Farneth y cols.⁴¹ reportan una $K_M = 0,192$ mM y $k_{cat} = 118 \text{ s}^{-1}$ para la lacasa de *Trametes versicolor* cuando se usa ABTS como donador de electrones.

4.2. Electrodos de carbono

4.2.1. Caracterización de los electrodos base

4.2.1.1. Caracterización electroquímica

Los diferentes electrodos de carbono usados durante el estudio (carbón vitrificado (GC), grafito pirolítico (PG), grafito de baja densidad (LDG) y grafito espectrocópico (SPG)) se caracterizaron mediante voltamperometría cíclica (figura 4.6) y cronoculombimetría (figura 4.7.a) usando ferricianuro potásico como sonda electroquímica.

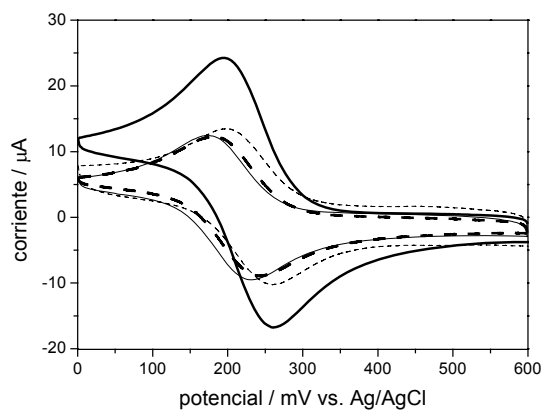


Figura 4.6. VCs en KCl 0,1 M pH 5,0 conteniendo 1 mM de ferricianuro potásico, velocidad de barrido 25 mV/s, de los electrodos de carbono GC (—), PG (—), LDG (- -) y SPG (--).

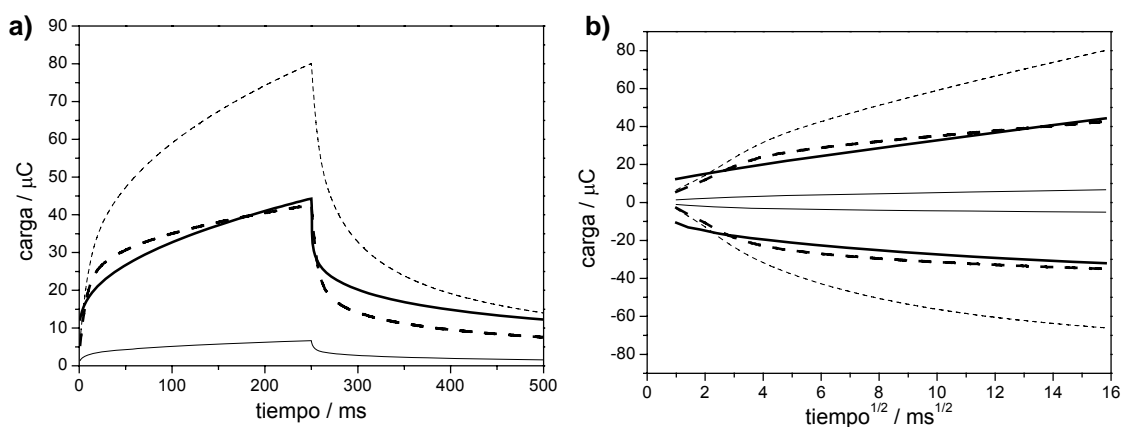


Figura 4.7. a) CCs en KCl 0,1 M pH 5,0 conteniendo 1 mM de ferricianuro potásico de los electrodos de carbono GC (—), PG (—), LDG (- -) y SPG (--). **b)** representación de Anson de los CCs representados en a.

Las medidas de voltamperometría cíclica están controladas por difusión lineal (la rugosidad del electrodo es despreciable frente al espesor de la capa de difusión) lo que no permite medir el área geométrica a partir de las corrientes de pico del voltamperograma cíclico (VC). Por otra parte, en las medidas en cronoculombimetría a tiempos muy cortos el espesor de la capa difusional es pequeño y por tanto la rugosidad de la superficie del electrodo no es despreciable, lo que permite la medida del área real o microscópica de los electrodos a partir de la pendiente de la recta obtenida en la representación de Anson de los cronoculombimogramas (CC) (figura 4.7.b). La tabla 4.6 recoge las áreas geométricas (A_{geo}) y microscópicas (A_{mic}) así calculadas. También se recogen en la tabla 4.6 el factor rugosidad (f), calculado como el cociente entre el área microscópica y el área geométrica, y el potencial formal (E') y la separación de pico (ΔE_p) obtenidos en los distintos electrodos cuando los VCs se realizaron en presencia de ferricianuro potásico a una velocidad de barrido de 25 mV s^{-1} . Como puede apreciarse, el potencial formal y la separación de picos obtenidos para el ferricianuro son muy similares para todos los electrodos, siendo la diferencia más significativa entre ellos su rugosidad. Así, mientras que los electrodos de grafito vitrificado y de carbono pirolítico son muy poco porosos ($f \approx 1$), el grafito de baja densidad presenta una gran porosidad ($f = 6,5$) y el SPG presenta una porosidad intermedia ($f = 2,2$).

Electrodo	A_{geo} cm^2	A_{mic} cm^2	f	E' mV	ΔE_p mV
GC	$0,068 \pm 0,002$	$0,06 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,3$	236 ± 5	64 ± 4
PG	$0,195 \pm 0,002$	$0,22 \pm 0,05$	$1,1 \pm 0,3$	228 ± 1	68 ± 3
LDG	$0,074 \pm 0,005$	$0,48 \pm 0,10$	$6,5 \pm 1,8$	212 ± 8	63 ± 13
SPG	$0,076 \pm 0,003$	$0,17 \pm 0,03$	$2,2 \pm 0,5$	209 ± 5	64 ± 11

Tabla 4.6. Caracterización de los electrodos de carbono. Valores calculados a partir de cinco experimentos independientes.

4.2.1.2. Distribución porosa

Para los electrodos LDG y SPG, que son los más rugosos, se realizaron isothermas de adsorción de N_2 y porosimetría de intrusión de mercurio para determinar su distribución porosa.

Blandford y Armstrong¹⁷ reportan, en un estudio similar realizado con electrodos de grafito pirolítico (PG), que la estructura microporosa presenta poros de más de 10 nm

de diámetro, un tamaño adecuado para que las enzimas penetren y queden fuertemente adsorbidas favoreciendo, además, una rápida transferencia electrónica directa.

En el caso de los electrodos LDG y SPG, sin embargo, la isoterma de adsorción de N_2 no revela la presencia de una estructura microporosa (la adsorción de N_2 no tiene lugar hasta presiones cercanas a la presión de saturación) (figura 4.8), por lo que esta técnica no nos puede ofrecer más información acerca de las muestras. Sin embargo, hay que destacar que en el caso de los electrodos SPG la adsorción es ligeramente superior y se observa un proceso de histéresis, que podría ser atribuible a la presencia de mesoporos (poros de menos de 50 nm)², lo que indica que el tamaño de poro de los electrodos SPG es menor al electrodo LDG.

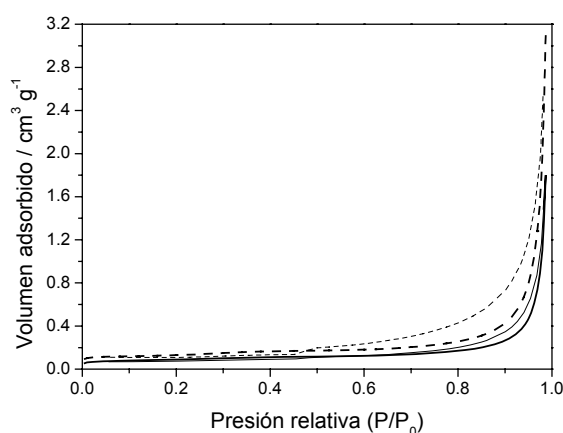


Figura 4.8. Isotermas de adsorción de los electrodos LDG (—) y SPG (---), la línea gruesa representa la isoterma de adsorción y la línea fina la isoterma de desorción.

El estudio de porosimetría de intrusión de mercurio, una técnica desarrollada para determinar el volumen y la distribución de tamaño de poro en sólidos macroporosos, ofreció mayor información sobre los dos tipos de grafito. Lo primero que puede observarse de la curva de intrusión/extrusión es que ambas muestras presentan histéresis (figura 4.9.a). La histéresis es un fenómeno normal en esta metodología y es debido al entramado de la muestra, que puede hacer que el hilo de Hg se rompa durante la despresurización, quedando parte del Hg atrapado en la muestra². Por otra parte el mercurio penetra en la estructura de los electrodos LDG a una presión menor, lo que indica un tamaño de poro mayor. Así, en la figura 4.9.b puede observarse claramente que el grafito LDG presenta una distribución de poro centrado en 5 μm , mientras que en el grafito SPG el tamaño de poro es menor (10-300 nm). La distribución de poro (figura 4.9.b) se ha calculado a través de la ecuación de Washburn², que relaciona el radio de poro (r^p) con la presión (p):

$$r^p = \frac{-2\gamma \cos \theta}{\Delta p} \quad (\text{ecuación 4.1})$$

donde, $\gamma = 484 \text{ mNm}^{-1}$ es la tensión superficial del mercurio y $\theta = 141^\circ$ es el ángulo estándar de contacto del mercurio con un sólido.

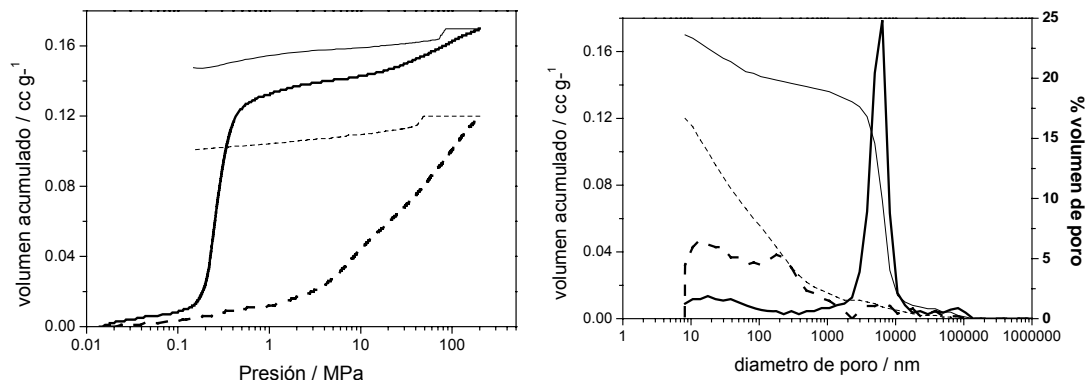


Figura 4.9. a) Curvas de intrusión/extrusión de Hg de los electrodos LDG (—) y SPG (- -), la línea gruesa representa la curva de intrusión y la línea fina la curva de extrusión. b) Distribución del tamaño de poro de los electrodos LDG (—) y SPG (- -). Volumen de Hg acumulado (línea fina) y volumen de poro (línea gruesa).

La tabla 4.7 resume los resultados obtenidos a partir del análisis de la porosimetría de intrusión de mercurio. El grafito LDG presenta mayor porosidad que el SPG, pero con un tamaño de poro mayor, por lo que su área superficial específica es 2,5 veces menor. Sin embargo la relación de áreas electroquímicas es inversa, presentando un área microscópica tres veces superior los electrodos LDG. Esta diferencia puede deberse al tipo de plano expuesto mayoritariamente en cada tipo de grafito. Así, una presencia mayoritaria de planos *basales*, menos reactivos electroquímicamente¹⁰, en los electrodos SPG resultará en un área electroquímica menor, a pesar de que el área superficial sea mayor. Por otro lado, una mayor cantidad de planos *edge* en los electrodos LDG resultará en un área electroquímica mayor, a pesar de presentar una menor área superficial.

	Área específica $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	Diámetro medio Nm	Porosidad %	Densidad g cm^{-3}
LDG	5.36	5467	27	2.22
SPG	14.10	14	20	2.12

Tabla 4.7. Resultados del análisis de porosimetría por intrusión de Hg.

4.2.2. Funcionalización de los electrodos de carbono

4.2.2.1. Recubrimiento de las superficies con una monocapa de 4-aminofenilos

4.2.2.1.1. Formación de la monocapa

Para la funcionalización de los electrodos de carbono se empleó el método electroquímico de reducción de sales de diazonio aromáticas desarrollado por el grupo de Saveant³. Superficies de carbono recubiertas con esta monocapa han sido ampliamente estudiadas y utilizadas como soporte para la inmovilización covalente y orientada de la enzima hidrogenasa en nuestro laboratorio^{4, 84}, por lo que en esta tesis se ha utilizado la misma metodología para la inmovilización del enzima lacasa.

En la figura 4.10 se esquematizan las distintas etapas electroquímicas junto a los VCs correspondientes. En una primera etapa la sal de diazonio 4-nitrobenceno se reduce en el electrodo con desprendimiento de nitrógeno, generando una monocapa de 4-nitrofenilos unida covalentemente a la superficie a través de un enlace C-C (figura 4.10 reacción a). En el primer ciclo del VC (figura 4.10.a) se observa una onda de reducción irreversible debida a las moléculas que se unen a la superficie. La intensidad de dicha onda es menor en el segundo ciclo debido al efecto bloqueante de los grupos ya unidos a la superficie⁷⁸.

La monocapa de 4-nitrofenilos obtenida es reducida de forma electroquímica en una segunda etapa (figura 4.10 reacción b) dando lugar a una monocapa mixta de 4-aminofenilos y 4-hidroxilaminofenilos²¹. La reducción de los grupos nitro tiene lugar durante el primer ciclo, observándose en el VC (figura 4.10.b) un pico irreversible de reducción a -1000 mV. La presencia de los grupos hidroxilamino en la monocapa conlleva la aparición de un proceso redox cuasi-reversible en el VC de reducción debido a la transformación del grupo hidroxilamino en nitroso²¹ (figura 4.10 reacción c). El potencial de dicho proceso redox varía con el pH, como puede verse comparando los VCs de la figura 4.10.b (segundo ciclo) y la figura 4.10.c.

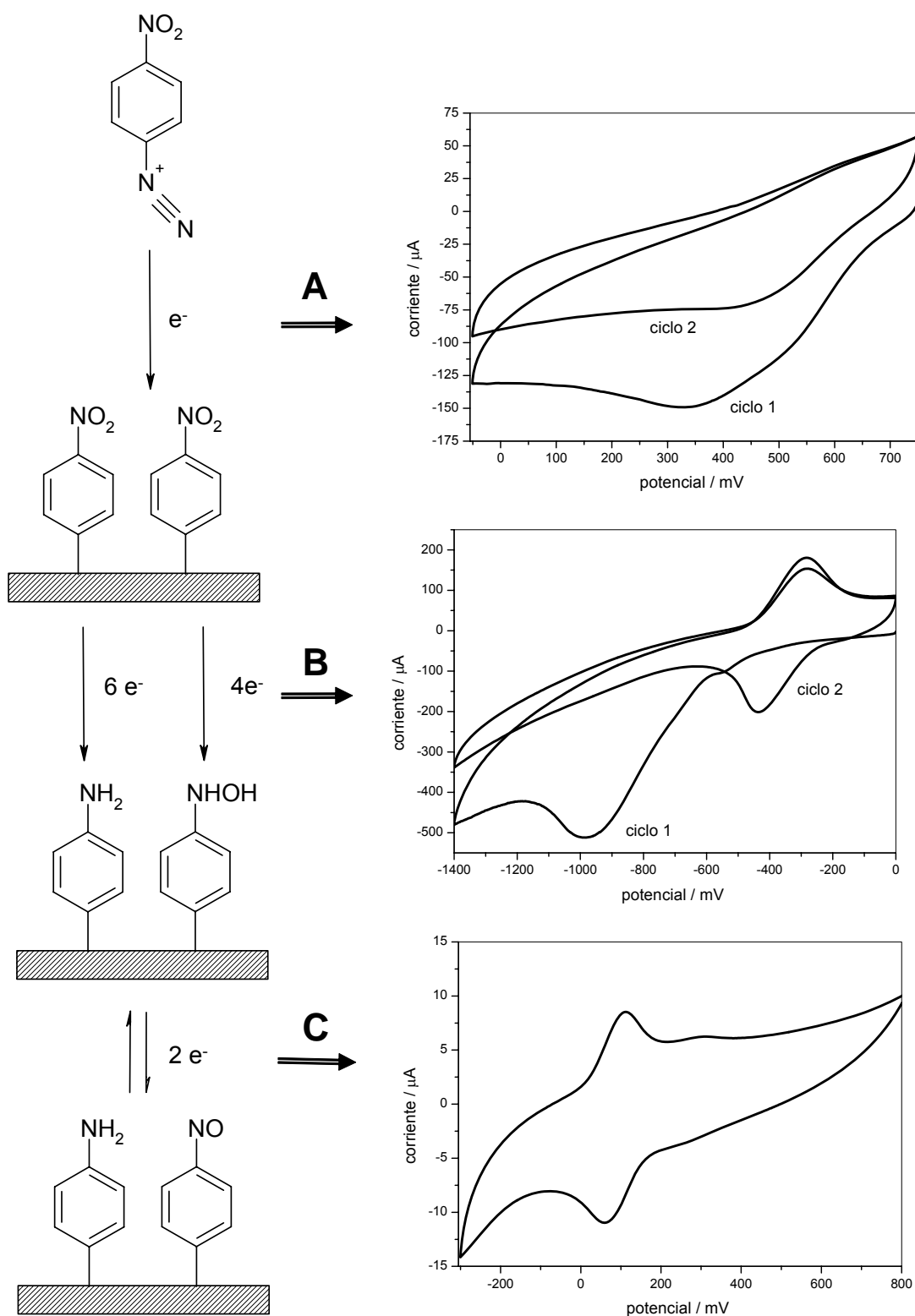


Figura 4.10. Funcionalización de electrodos de carbono LDG con la monocapa mixta de aminofenilos e hidroxilaminos. **a)** Reducción de la sal de diazonio en la superficie electródica dando como resultado el enlace covalente a la misma. VC en CH_3CN , 200 mV s^{-1} . **b)** Reducción de los grupos nitro de la monocapa dando como resultado grupos amino e hidroxilamino. VC en etanol:agua 1:9, 200 mV s^{-1} . **c)** Electroquímica de los grupos hidroxilaminos. VC en acetato pH 4,2, 10 mV s^{-1} .

4.2.2.1.2. Características de la monocapa de aminofenilos covalentemente unida a las distintas superficies de carbono

El recubrimiento de la monocapa de aminofenilos sobre los diferentes tipos de electrodos se calculó a partir de la integración del voltamperograma de reducción de los grupos nitro (figura 4.10.b). Para el calculo hay que tener en cuenta que en el primer ciclo de reducción la onda obtenida corresponde a la reducción de los grupos nitro a amino ($6 e^-$) y a hidroxilamino ($4 e^-$) (figura 4.10 reacción b), mientras que en el segundo ciclo la onda de reducción observada se debe exclusivamente a la transformación bielectrónica de los grupos hidroxilaminos a nitrosos (figura 4.10 reacción c). De este modo, además del recubrimiento total de la monocapa, es posible calcular el porcentaje de grupos amino e hidroxilamino formados.

La tabla 4.8 recoge los datos sobre el recubrimiento total de la monocapa mixta (Γ_t), el porcentaje de grupos amino presentes en la monocapa, y el potencial redox formal (E') y la separación de picos (ΔE_p) del par hidroxilamina/nitroso en tampón acetato 50 mM NaClO₄ 100 mM pH 4,2 cuando el VC se registró a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} (figura 4.10.c). Para el cálculo del recubrimiento se consideró el área microscópica de los electrodos.

electrodo	Γ_t mol cm^{-2}	% NH ₂	E' mV	ΔE_p mV
GC	$2,4 \pm 0,6 \cdot 10^{-9}$	51 ± 9	78 ± 11	81 ± 14
PG	$4,2 \pm 0,6 \cdot 10^{-9}$	43 ± 4	61 ± 6	56 ± 7
LDG	$2,2 \pm 0,8 \cdot 10^{-9}$	31 ± 12	75 ± 6	53 ± 2
SPG	$4,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-9}$	38 ± 11	69 ± 4	53 ± 7

Tabla 4.8. Características de la monocapa mixta de aminofenilos/hidroxilaminas en diferentes superficies de carbono. Todos los valores se han calculado a partir de cinco experimentos independientes.

El recubrimiento obtenido en todos los casos es entre 1,6 y 3,2 veces superior al recubrimiento teórico para una monocapa de anillos fenólicos, estimado en $1,35 \cdot 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ ⁷⁸, por lo que es posible que en algunos tipos de electrodos, sobre todo PG y SPG, se favorezca la formación de multicapas^{21, 51}. La figura 4.11 esquematiza el proceso de formación de la multicapa que tendría lugar durante la etapa de reducción de la sal de diazonio en la superficie. La especie radical, generada electroquímicamente, se

uniría covalentemente al anillo nitrofenilo en lugar de a la superficie electródica. Sucesivamente, otra especie radical reaccionaría con el anillo nitrofenilo más alejado del electrodo, y por tanto más accesible, generando así una multicapa.

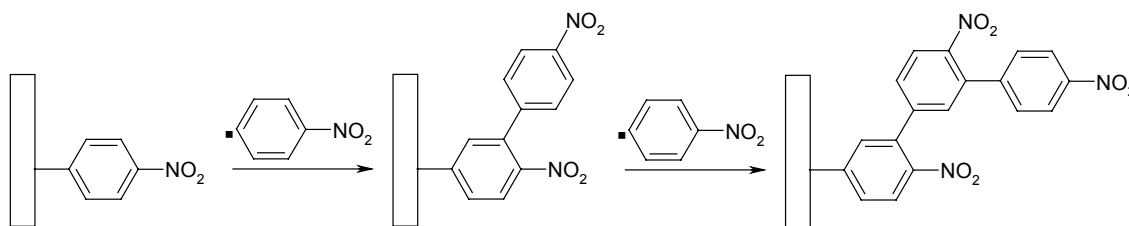


Figura 4.11. Formación de multicapas durante la reducción electroquímica de la sal de diazonio en el electrodo⁵¹.

La separación de picos del par redox hidroxilamina/nitroso de la monocapa (tabla 4.7) es superior a lo esperado para una especie adsorbida en la superficie¹², lo que indica una limitación cinética en la transferencia de electrones o protones.

4.2.2.2. Recubrimiento de las superficies con una monocapa de *orto*-aminofenoles

4.2.2.2.1. Formación de la monocapa

La funcionalización de los electrodos de carbono con una monocapa de *orto*-aminofenoles se basa en la metodología utilizada por Nassef y cols.^{74, 75}, generando químicamente la sal de diazonio que posteriormente se utilizará para la funcionalización del electrodo.

En la figura 4.12 se esquematizan los pasos electroquímicos precisos para la formación de la monocapa, así como los VCs obtenidos en cada etapa para un electrodo LDG. En un primer paso la sal de diazonio de *orto* nitrofenoles generada “in situ” se reduce en el electrodo con desprendimiento de nitrógeno, obteniéndose de esta forma una monocapa de *orto*-nitrofenoles unida covalentemente al electrodo mediante un enlace C-C (figura 4.12 reacción a). En el VC de reducción de esta etapa no es posible observar el proceso de reducción de la sal de diazonio; en cambio, se observa la presencia de dos pares redox, uno reversible a unos 200 mV y otro cuasi-reversible a unos 400 mV (figura 4.12.a). Dichos procesos pueden ser debidos a reacciones redox de los reactivos de partida (nitrito y 2-nitro-4-aminofenol) que, por encontrarse en mayor concentración, impiden distinguir la señal de reducción de la sal de diazonio.

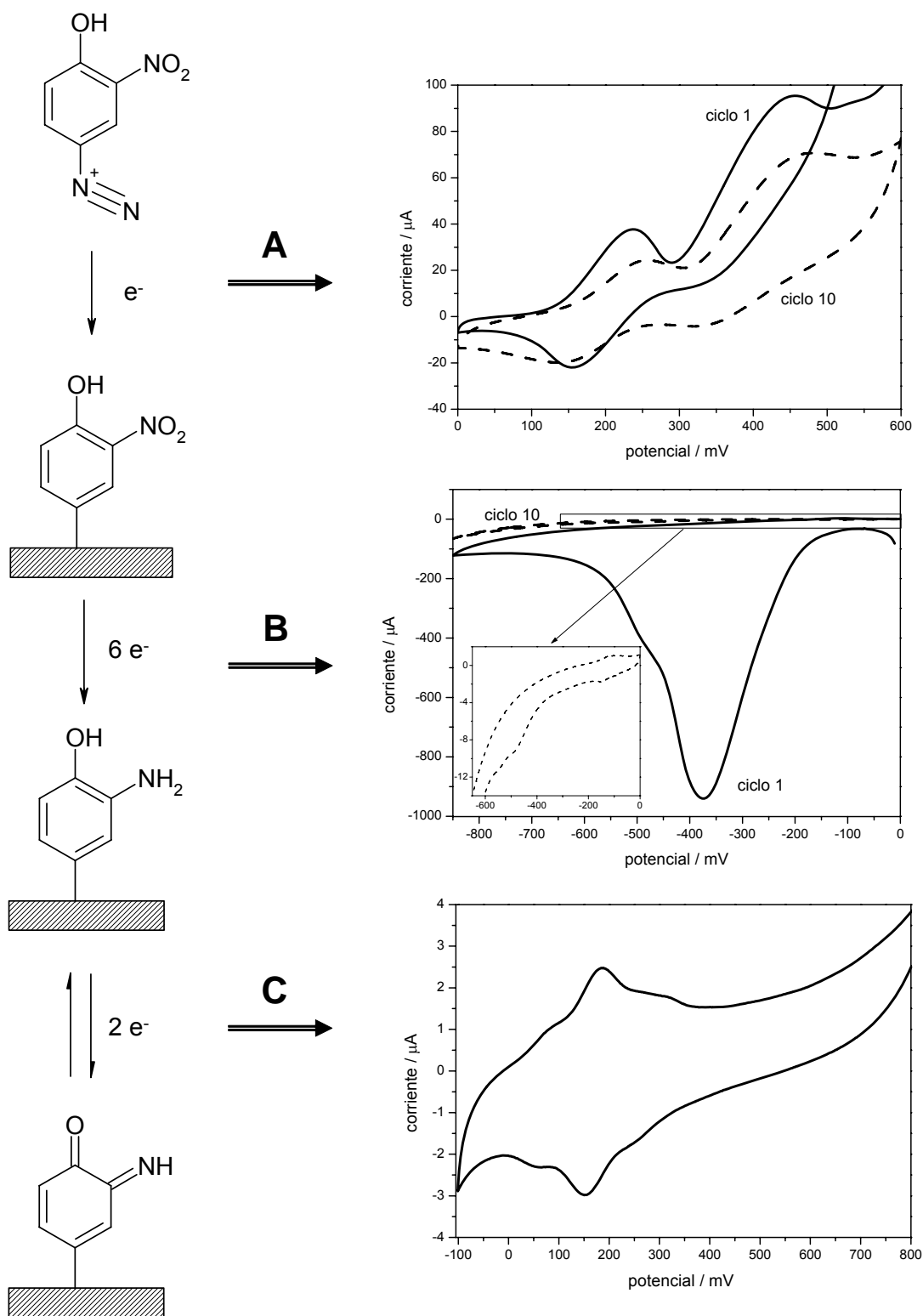


Figura 4.12. Funcionalización de electrodos de carbono con la monocapa de aminofenoles. **a)** Reducción de la sal de diazonio (formada químicamente) en la superficie electródica dando como resultado el enlace covalente a la misma. VC en HCl 2 mM conteniendo NaNO_2 y 2-nitro-4-aminofenol **b)** Reducción de los grupos nitro de la monocapa a grupos amino. CV en H_2SO_4 . Inserto, ampliación de la señal para el ciclo 10. **c)** Electroquímica de la monocapa. VC en tampón acetato pH 4,2, 10 mV s^{-1} .

Posteriormente se procede a la reducción electroquímica del grupo nitro de la monocapa de *orto*-nitrofenoles, obteniéndose así una monocapa de *orto*-aminofenoles unida covalentemente al electrodo (figura 4.12 reacción b). El VC de esta etapa muestra un pico de reducción a -375 mV apenas perceptible en el segundo ciclo (figura 4.12.b), lo que indica que la reducción de todos los grupos nitro tiene lugar durante el primer barrido. No obstante, la corriente obtenida en este proceso no se debe exclusivamente a la reducción de los grupos nitro, puesto que controles de electrodos no modificados con la sal de diazonio también presentan este pico, aunque de menor intensidad. Por otra parte, Nassef y cols.⁷⁵ no mencionan la reducción del grupo nitro a grupos aminos e hidroxilaminos previamente observaba para la reducción de nitrofenilos²¹. Sin embargo, en el VC de reducción de *orto*-nitrofenoles, es posible distinguir un pequeño proceso redox atribuible a la presencia de hidroxilaminas (figura 4.12.b inserto). No obstante, la carga asociada a dicho proceso es despreciable en comparación con la detectada en la formación de la monocapa de aminofenilos (figura 4.10.b).

El voltamperograma de la monocapa de aminofenoles en tampón acetato revela la presencia de tres procesos redox con potenciales aproximados de +50, +150 y +250 mV (figura 4.12.c). El pico de mayor intensidad (a 150 mV) se puede asociar con el intercambio bielectrónico que sufre la especie quimisorbida para formar *orto*-quinonaimina⁷⁵, como se representa en la reacción c de la figura 4.12. Los otros picos pueden ser atribuidos a la presencia de hidroxilaminas, ya sea debido a su reducción a nitroso que ocurriría a +50 mV, por analogía con la señal obtenida en la monocapa de hidroxilaminofenilos (figura 4.10.c), o a la formación de *orto*-quinonaimina a +250 mV en una reacción redox favorecida energéticamente por la presencia del grupo hidroxilamino en lugar del grupo amino.

Para comprobar que sobre el electrodo se había formado la monocapa de *orto*-aminofenoles, se probó su capacidad para catalizar la reacción de oxidación de NADH, tal y como describen Nassef y cols.⁷⁴. Así, se midió la oxidación de NADH en un electrodo de GC desnudo, comparándola con la respuesta obtenida tras haber funcionalizado el electrodo con la monocapa de aminofenoles. En la figura 4.13 claramente se observa el efecto electrocatalítico de esta monocapa sobre el NADH: el potencial redox de inicio de la oxidación de NADH se desplaza 200 mV hacia menores potenciales respecto al electrodo desnudo y se obtiene un plató de corriente de oxidación a 250 mV. También se observó, como reportan en el trabajo, que el uso

continuado del electrodo conlleva una pérdida de señal debido al ensuciamiento del electrodo durante la oxidación del NADH⁷⁴.

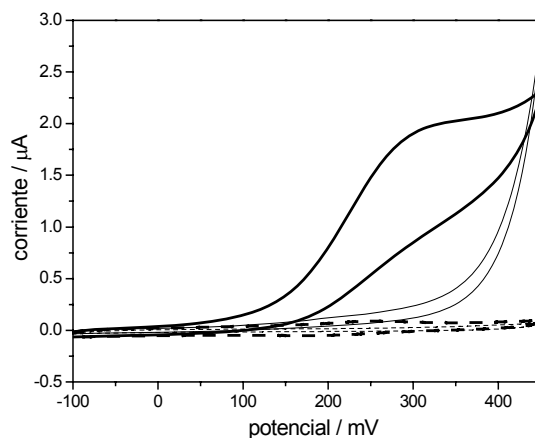


Figura 4.13. VC de oxidación de NADH 4mM en un electrodo de carbón vitrificado funcionalizado con aminofenoles (línea gruesa) y desnudo (línea fina). Los controles en ausencia de NADH se representan en línea discontinua. Tampón fosfato 100 mM, pH 7,0. Velocidad de barrido 10 mV s⁻¹.

4.2.2.2.2. Optimización de la formación de la monocapa

La metodología de formación de la monocapa se basa en el método descrito por Nassef y cols., quienes, en su trabajo, lo utilizan como electrocatalizador para la reacción de oxidación de hidrazina⁷⁵ o NADH⁷⁴. Por lo tanto, fue preciso optimizar la metodología de formación de la monocapa con el fin de conseguir mayor capacidad de inmovilización de lacasa electroactiva sobre el electrodo. Para ello se estudió el efecto que las distintas variables que afectan a la formación de la monocapa (número de ciclos de VC, concentración de los reactivos y tiempo de reacción) tenían sobre el recubrimiento de la monocapa y sobre la corriente catalítica de reducción de oxígeno por parte de la lacasa inmovilizada. Estos estudios se realizaron usando un electrodo LDG. El recubrimiento de la monocapa (Γ) se midió por integración del pico catódico del VC de la monocapa en tampón acetato a 10 mV s⁻¹ (figura 4.12.c), considerando el área microscópica del electrodo (0,48 cm²). Sobre los electrodos funcionalizados se inmovilizó covalentemente el enzima lacasa mediante formación de enlace amida, usando tampón fosfato 10 mM pH 8,0 para las disoluciones, tal y como se explica en el apartado 3.2.7.2 de Materiales y Métodos. Las corrientes catalíticas directas (CCD) y mediadas (CCM) se calcularon a partir del CA a 200 mV en acetato 50 mM NaClO₄ 100 mM pH 4,2. La CCD se calculó como la diferencia entre la intensidad de corriente

obtenida bajo saturación de oxígeno y la intensidad de corriente bajo saturación de nitrógeno. La CCM se obtuvo como la diferencia entre la corriente obtenida en presencia de ABTS 0,2 mM y la corriente obtenida al añadir al medio NaF 10 mM (inhibidor de lacasa), ambas en condiciones de saturación de oxígeno.

La primera variable estudiada fue el número de ciclos de voltamperometría cíclica aplicados durante la reducción electroquímica para unir covalentemente la sal de diazonio al electrodo (figura 4.12.a). Se observó que el recubrimiento de la monocapa (Γ) aumentó con el número de ciclos (tabla 4.9). Por otra parte, la actividad enzimática aumentó notablemente al pasar de 2 a 10 ciclos de funcionalización, aunque por encima de 10 ciclos el aumento es mínimo para la corriente mediada e incluso la corriente electrocatalítica directa disminuye (tabla 4.9). En base a estos resultados, se estableció un protocolo de formación de la monocapa de diez ciclos.

nº ciclos formación	Γ mol cm ⁻²	CCD μA	CCM μA
2 ciclos	$0,9 \cdot 10^{-11}$	- 1,8	- 5,2
10 ciclos	$1,5 \cdot 10^{-11}$	- 2,5	- 10,1
20 ciclos	$2,1 \cdot 10^{-11}$	- 1,3	- 10,4

Tabla 4.9. Optimización del número de ciclos de VC durante la formación de la monocapa de *orto*-nitrofenoles en un electrodo LDG. Concentración de reactivos: 7,5 mM; tiempo de reacción: 60 minutos.

A continuación se investigó la influencia de las concentraciones de los reactivos usados en la etapa química de formación de la sal de diazonio. Se partió de las concentraciones iniciales (C) descritas por Nassef y cols.^{74, 75}, 7,5 mM para el 4-amino-2-nitrofenol y el nitrito sodico, aumentando su concentración hasta cinco veces (5xC) y manteniendo la proporción de reactivos. Se observó un claro aumento del recubrimiento de la monocapa de aminofenoles al aumentar la concentración de reactivos iniciales hasta tres veces (3xC), aunque concentraciones mayores de reactivos supusieron una pérdida de señal electroquímica de la monocapa (figura 4.14 y tabla 4.10). Esta disminución de la señal puede deberse a la alta reactividad de la sal de diazonio generada, que conlleva a su degradación por reacciones intermoleculares a altas concentraciones, disminuyendo así la concentración real de la misma. La señal electrocatalítica de reducción de oxígeno por parte de la lacasa inmovilizada en la monocapa sigue la misma tendencia que el recubrimiento, obteniéndose un máximo

para la corriente, tanto directa como mediada, cuando las concentraciones de reactivos son entre tres y cuatro veces superiores a los descritos por Nassef y cols. (tabla 4.10).

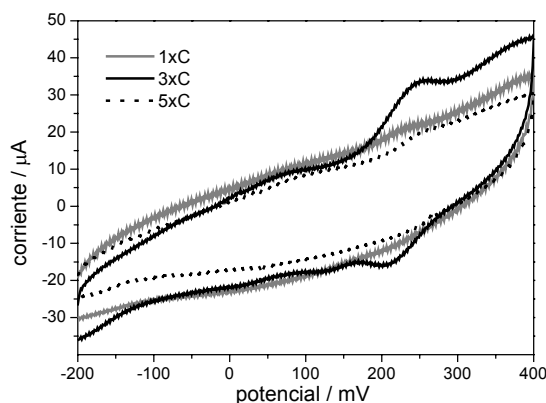


Figura 4.14. Efecto de la concentración de reactivos de partida en el VC de la monocapa de aminofenoles en tampón acetato pH 4,2. C corresponde a una concentración 7,5 mM.

concentración reactivos	Γ mol cm^{-2}	CCD μA	CCM μA
1xC	$1,5 \cdot 10^{-11}$	- 2,5	- 10,1
2xC	$2,0 \cdot 10^{-11}$	- 11,6	- 18,1
3xC	$11,0 \cdot 10^{-11}$	- 19,4	- 25,5
4xC	$6,5 \cdot 10^{-11}$	- 17,8	- 28,6
5xC	$3,1 \cdot 10^{-11}$	- 4,9	- 9,3

Tabla 4.10. Optimización de la concentración de reactivos de la etapa química para la funcionalización de un electrodo LDG con una monocapa de aminofenol (10 ciclos de VC, tiempo de reacción 60 minutos). La concentración inicial (C) es 7,5 mM⁷⁴.

Por último se estudió el tiempo de reacción en la etapa química de formación de la sal de diazonio. En este caso se obtuvo un recubrimiento óptimo para un tiempo de incubación de 60 minutos (tabla 4.11). A tiempos mayores (120 min) se observa una disminución en el recubrimiento de la monocapa, posiblemente como consecuencia de la degradación de la sal de diazonio. La corriente electrocatalítica de reducción de oxígeno por parte de la lacasa inmovilizada siguió la misma tendencia.

tiempo reacción minutos	Γ mol cm^{-2}	CCD μA	CCM μA
30	$2,8 \cdot 10^{-11}$	- 1,4	- 4,3
60	$11,0 \cdot 10^{-11}$	- 19,4	- 25,5
120	$1,4 \cdot 10^{-11}$	- 2,8	- 7,1

Tabla 4.11. Optimización del tiempo de reacción entre los reactivos en la etapa química de formación de la sal de diazonio para la posterior funcionalización de un electrodo LDG (concentración de reactivos 3xC = 22,5 mM, 10 ciclos de formación).

A partir de estos experimentos se estableció la metodología óptima para la formación de la monocapa. Con respecto al método descrito por Nassef y cols⁷⁴, esta metodología supone un aumento de tres veces las concentraciones iniciales de reactivo y un aumento a diez ciclos de voltamperometría cíclica en la etapa de unión covalente de la sal de diazonio al electrodo. De este modo se consiguió aumentar el recubrimiento de la monocapa de aminofenoles en el electrodo de LDG, lo cual redundó en una mayor densidad de grupos funcionales aptos para formar enlace covalente con la lacasa, esto es, una mayor cantidad de lacasa electroactiva inmovilizada, como reflejan los resultados de electrocatálisis enzimática obtenidos.

Además, los resultados experimentales permiten deducir que para aumentar el recubrimiento de grupos aminofenoles es más efectivo aumentar la concentración de los reactivos que el número de ciclos de VC. Otra observación que merece destacarse es que utilizando concentraciones más altas de reactivos de formación de la monocapa (entre 3xC y 5xC) la relación entre corrientes electrocatalíticas directas y mediadas es mucho mayor que utilizando concentraciones más bajas y mayor número de ciclos de VC (tablas 4.9 y 4.10). Esto puede explicarse por un mayor recubrimiento “horizontal” de la capa de aminofenoles sobre el electrodo en el caso de altas concentraciones de reactivos, minimizándose el crecimiento en “vertical”, el cual podría verse favorecido al aumentar el número de ciclos (figura 4.15). De esta forma, favoreciendo el crecimiento “horizontal” de la monocapa las moléculas de lacasa quedarían ancladas más cercanas a la superficie del electrodo y mejoraría la transferencia electrónica directa.

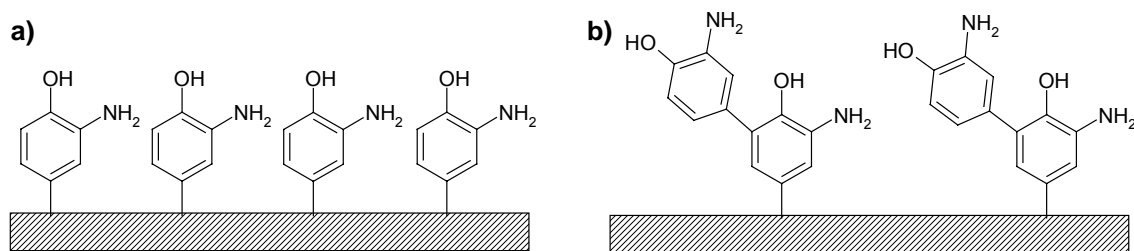


Figura 4.15. Posibles formas de crecimiento de la monocapa en el electrodo: **a)** crecimiento horizontal; **b)** crecimiento vertical.

4.2.2.2.3. Características de la monocapa de aminofenoles covalentemente unida a las distintas superficies de carbono

La variación de la intensidad de pico con la velocidad de barrido en el VC de un electrodo LDG modificado con una monocapa de aminofenoles se muestra en la figura 4.16. La intensidad de pico guarda una relación lineal con la velocidad de barrido hasta 200 mV s^{-1} , como es de esperar para una reacción redox confinada en la superficie electródica (figura 4.16.a). El valor de la separación de picos (figura 4.16.b) es relativamente bajo, como corresponde a una especie adsorbida en el electrodo; sin embargo varía linealmente con la velocidad de barrido, lo que indica que la reacción es cuasireversible, es decir hay limitación cinética del proceso redox.

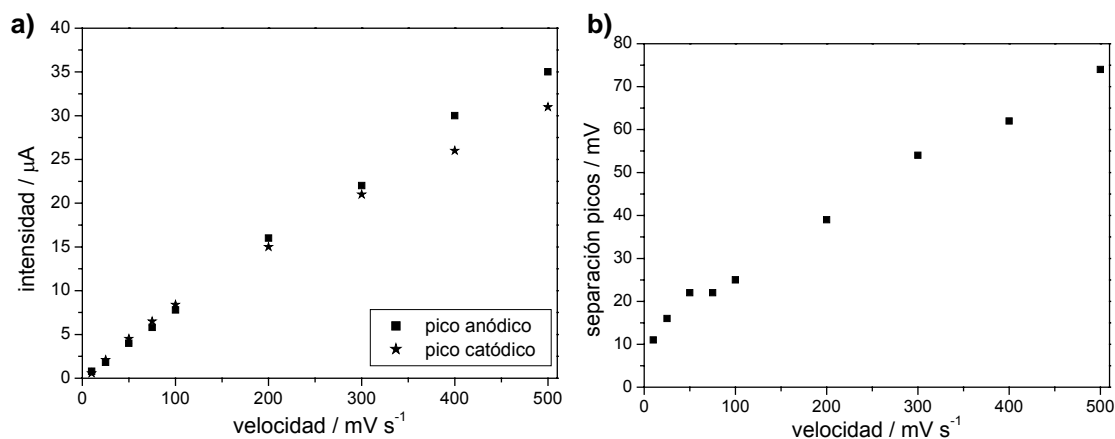


Figura 4.16. Variación de la intensidad de pico **(a)** y de la separación de pico **(b)** para la monocapa de aminofenoles covalentemente unida a un electrodo LDG. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM pH 4,2.

La variación lineal de la separación de picos (ΔE_p) con la velocidad de barrido nos permite calcular la constante de transferencia electrónica heterogénea por el método

de Laviron⁵⁵. Para el sistema aminofenol-quinonaimida, el número de electrones intercambiados (n) es 2, por lo tanto, el valor de $n \cdot \Delta E_p$ de los datos experimentales obtenidos es menor de 200 mV. En este caso no nos encontramos en condiciones limitantes, pero podemos calcular el valor del parámetro m definido por Laviron mediante extrapolación de la gráfica $n \cdot \Delta E_p$ frente a m^{-1} considerando un valor de $\alpha = 0,5$ (figura 4.17).

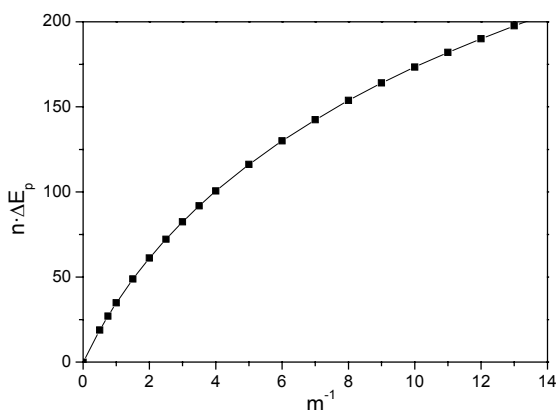


Figura 4.17. Relación entre el valor de $n \cdot \Delta E_p$ y m^{-1} para $\alpha = 0,5$ (figura realizada a partir de los datos de la tabla 1 del trabajo de Laviron⁵⁵)

Conocido el valor de m se puede calcular el valor de la constante de transferencia electrónica (k_s) puesto que

$$m = \frac{RTk_s}{F\nu v} \quad (\text{ecuación 4.2})$$

donde, R es la constante de los gases ideales ($8,31 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$), T es la temperatura (298 K), F es la constante de Faraday (96840 C mol^{-1}), n es el número de electrones intercambiados y ν es la velocidad de barrido (V s^{-1}).

Usando los datos de la figura 4.15.b, se obtuvo un valor promedio de la constante de transferencia electrónica para el sistema aminofenol/quinonaimida quimisorbido sobre un electrodo de grafito de $k_s = 5,4 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ (tabla 4.12)

$\Delta E_p / \text{V}$	74	62	54	39	25
$\nu / \text{V s}^{-1}$	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
m^{-1}	7,5	5,4	4,5	2,8	1,6
k_s / s^{-1}	5,2	5,8	5,2	5,7	4,9

Tabla 4.12. Parámetro m^{-1} y valor de k_s obtenidos para los datos de la figura 4.16.b.

La tabla 4.13 recoge los datos sobre el recubrimiento de la monocapa (Γ), el potencial redox formal (E') y la separación de picos (ΔE_p) obtenidos en tampón acetato para las diferentes superficies de carbón funcionalizadas con la monocapa de aminofenoles. Todos los valores se calcularon a partir del VC de la monocapa registrado en tampón acetato 50 mM NaClO₄ 100 mM pH 4,2 a 10 mV s⁻¹ (figura 4.12.c). El recubrimiento de la monocapa se calculó integrando el pico catódico del VC, considerando que es debido a la transformación bielectrónica del aminofenilo a quinonaimina (figura 4.9 reacción c). Para calcular su valor se tuvo en cuenta el área microscópica de cada electrodo (tabla 4.6).

Electrodo	Γ mol cm⁻²	E' mV	ΔE_p mV
GC	$0,13 \pm 0,04 \cdot 10^{-10}$	209 ± 8	35 ± 6
PG	$0,8 \pm 0,2 \cdot 10^{-10}$	212 ± 1	99 ± 1
LDG	$2,1 \pm 0,9 \cdot 10^{-10}$	166 ± 7	28 ± 8
SPG	$14 \pm 4 \cdot 10^{-10}$	170 ± 2	27 ± 4

Tabla 4.13. Características de la monocapa de *orto*-aminofenoles en las diferentes superficies de carbono. Todos los valores se han calculado a partir de cinco experimentos independientes.

En este caso los recubrimientos son menores que para la monocapa mixta de aminofenilos/hidroxilaminos, y, excepto para el caso del SPG, el recubrimiento corresponde aproximadamente a un 10 % del valor teórico calculado para una monocapa de anillos fenólicos, $1,35 \cdot 10^{-9}$ mol cm⁻² ⁷⁸. Sin embargo, este factor no impide la unión covalente del enzima, obteniendo unos valores de intensidad de corriente similares a los obtenidos con la monocapa de aminofenilos, como se demostrará más adelante. Esto puede deberse a que el recubrimiento de una monocapa compacta de enzima en la superficie electródica es tres ordenes de magnitud menor que el recubrimiento de una monocapa compacta de anillos fenólicos⁷⁸, por lo que un electrodo funcionalizado con un 10% de una monocapa compacta será suficiente para soportar una monocapa compacta de enzima lacasa.

4.2.3. Medida de la actividad electrocatalítica de la lacasa de *Trametes hirsuta*

El objetivo de este estudio es optimizar las condiciones de medida de la actividad de la lacasa de *T. hirsuta* inmovilizada en el electrodo de modo que los valores de corriente registrados sean lo más altos posibles, aumentando por tanto la sensibilidad del método, y que la estabilidad en condiciones operacionales sea muy alta. Esto último es muy importante para realizar estudios electroenzimáticos que requieran tiempos largos de medida y para posibles aplicaciones en biopilas de combustible.

4.2.3.1. Efecto del pH

El pH más adecuado para la medida de actividad catalítica de lacasa de *T. hirsuta* se estudió en primer lugar con la enzima en disolución, midiendo espectrofotométricamente la velocidad de oxidación de ABTS por parte de la lacasa, tal y como se describe en el apartado 3.2.1.2. de Materiales y Métodos.

El pH óptimo descrito en la bibliografía para la lacasa de *T. hirsuta* esta entre 3,5-4,5⁹¹, por lo que como posibles tampones de medida se probaron los más comunes utilizados al trabajar con lacasas para abarcar el intervalo de pH 3-6: citrato-fosfato 50 mM pH 3,0, acetato 50 mM pH 4,5 y fosfato 50 mM pH 6,0. En todos los ensayos la fuerza iónica se aumentó añadiendo a los tampones NaClO₄ 100 mM puesto que para las posteriores medidas electroquímicas era necesario tener una fuerza iónica elevada en la disolución para disminuir la resistencia ohmica.

En la figura 4.18 se representan los valores de actividad enzimática y la estabilidad de la misma en función del pH del tampón en que se mide y almacena la lacasa de *T. hirsuta*. Para realizar las medidas se prepararon tres muestras de lacasa, diluidas 1000 veces respecto a la disolución madre, cada una en un tampón a un pH diferente: fosfato 50 mM, NaClO₄ 100 mM pH 6,0; acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM pH 4,5; y citrato-fosfato 50 mM, NaClO₄ 100 mM pH 3,0. Cada cierto tiempo se midió la actividad de las muestras, usando ABTS 1 mM como sustrato. Entre medidas, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

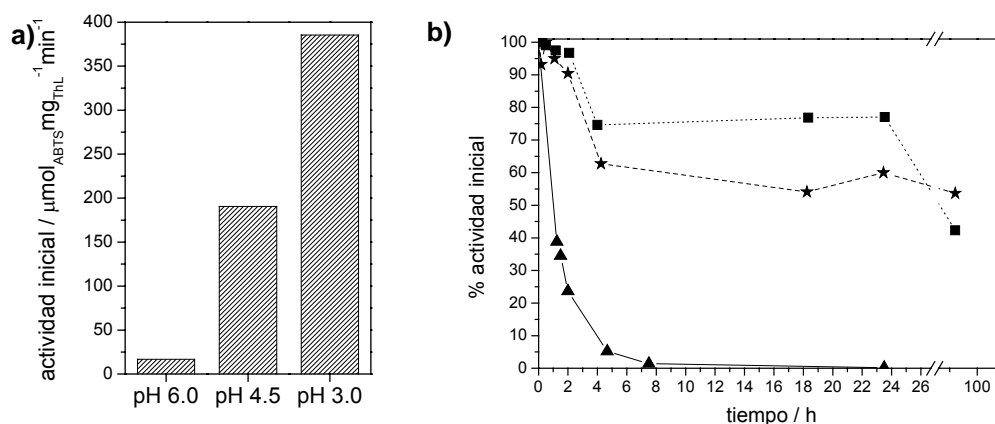


Figura 4.18. Actividad de la enzima lacasa en disolución, usando ABTS 1 mM como mediador, en distintos tampones y pHs (ver texto). **a)** actividad inicial, a tiempo cero. **b)** variación de la actividad con el tiempo a pH 3.0 (▲), pH 4.5 (■), pH 6.1 (★).

Como puede verse en la figura 4.18.a, la mayor actividad inicial se obtiene a pH 3,0, pero en esas condiciones la enzima pierde rápidamente actividad, reteniendo sólo un 25 % de la misma a las 2 horas (figura 4.18.b). Por el contrario, a pH 4,5 la actividad inicial de la enzima es aproximadamente la mitad que a pH 3,0, sin embargo, su valor es muy estable, reteniendo el 40 % a las 96 horas (4 días). Como era de esperar puesto que la mayor parte de lacasas se inhiben por los iones hidroxilos⁹, a pH 6,0 la actividad de la enzima fue muy baja, sin embargo su valor se mantuvo estable, reteniendo más del 50 % de la actividad inicial a las 96 horas. Por otra parte, medidas realizadas a 4°C revelaron una mejoría en la estabilidad de todas las muestras, siendo en este caso también mayor la pérdida de actividad para las muestras almacenadas en tampón citrato-fosfato pH 3,0. Por último, medidas realizadas en ausencia de perclorato ofrecieron los mismos resultados que cuando la sal estaba presente, por lo que se dedujo que no afectaba a la capacidad catalítica ni a la estabilidad de la enzima.

En base a estos resultados se pudo concluir que las muestras de lacasa madre, disueltas en tampón fosfato pH 6,5, mantuvieron prácticamente constante su actividad, puesto que, desde que eran descongeladas, se gastaban en una o dos semanas, conservándolas durante ese tiempo a 4°C.

También se realizaron medidas de estabilidad de la actividad enzimática en función del pH en experimentos en los que la enzima se encontraba covalentemente unida al electrodo, puesto que de esta forma era posible medir la actividad de reducción de O₂ de la lacasa sin necesidad del uso de mediadores. En este caso se midió la corriente de reducción de oxígeno en cronoamperometría, variando el pH de una

disolución de acetato 50 mM que contenía 100 mM de NaClO_4 . Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos de forma mediada con el enzima en disolución, obteniendo una mayor estabilidad de la señal cuando la medida se realizó en acetato pH 4,5 que cuando se midió en acetato pH 3,0 (figura 4.19.b). Sin embargo en este caso la diferencia de actividad entre ambos pHs no es tan marcada como cuando la actividad se midió con la enzima en disolución (figura 4.19.a).

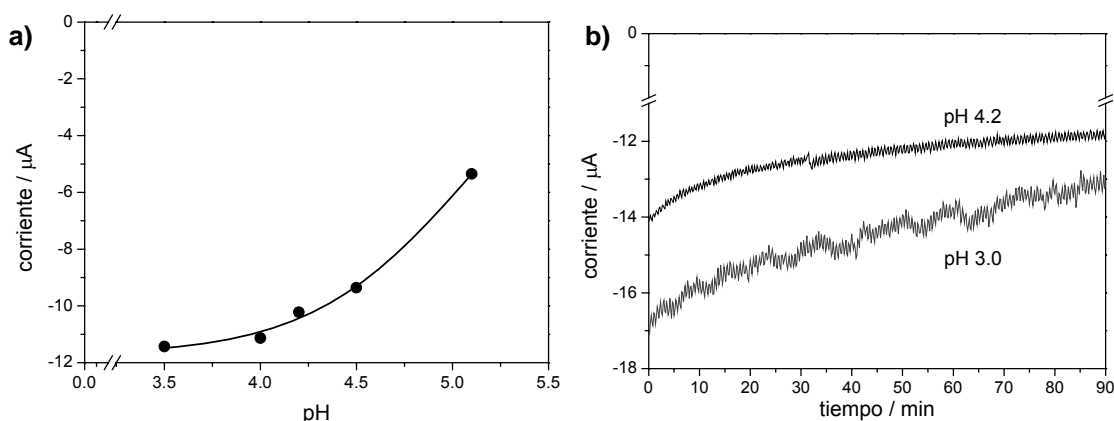


Figura 4.19. Corrientes obtenidas en CA para un electrodo LDG funcionalizado con monocapa de aminofenilos, sobre el que se ha inmovilizado covalentemente la enzima lacasa, medidas en acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM. **a)** variación de la corriente en función del pH, **b)** estabilidad de la corriente medida en CA, bajo borboteo de oxígeno, en acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM a pH 4,2 y pH 3,0.

En base a estos resultados se estableció como tampón de trabajo el de acetato 50 mM conteniendo 100 mM de NaClO_4 a pH 4,2, ya que las corrientes electrocatalíticas en estas condiciones son próximas al máximo y bastante estables.

Cabe destacar que durante el presente trabajo se utilizaron dos lotes diferentes de lacasa de *T. hirsuta*, encontrándose diferencias en el comportamiento de las mismas. Estas diferencias se atribuyeron a problemas asociados al proceso de purificación del segundo lote, puesto que, durante el mismo, se observó una pérdida del característico color azul de la enzima. Posteriormente se recuperó el color y la lacasa obtenida presentó actividad catalítica, aunque el comportamiento de este lote de enzima fue diferente en algunos casos. En el caso que nos ocupa, se observó una menor estabilidad de esta lacasa respecto al primer lote. En la figura 4.20 se aprecia esa diferencia de estabilidad, tanto cuando la enzima se encuentra en disolución (usando ABTS como sustrato) (figura 4.20.a) como cuando se encuentra inmovilizada covalentemente en el electrodo (electrocatalisis directa de oxígeno) (figura 4.20.b). Hay que destacar que con

ambos lotes la estabilidad es mayor cuando la lacasa se encuentra inmovilizada que cuando se encuentra en disolución. Este efecto de aumento de la estabilidad al inmovilizar covalentemente enzimas sobre superficies funcionalizadas ha sido ampliamente descrito^{52, 65}.

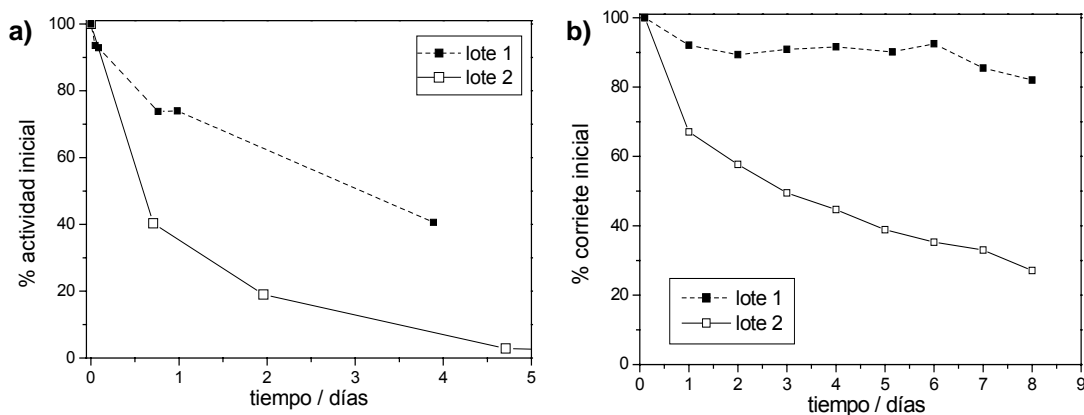


Figura 4.20. Diferencia de actividad entre los diferentes lotes utilizados de lacasa de *T. hirsuta* en tampón acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM pH 4,2. **a)** Actividad medida en disolución usando ABTS como mediador. **b)** Actividad electrocatalítica directa de reducción de oxígeno medida con la enzima inmovilizada covalentemente en un electrodo.

4.2.3.2. Efecto de la temperatura

Consideraremos como temperatura óptima de medida aquella a la que se obtenga la máxima intensidad de corriente catalítica sin que se produzca la desnaturalización de la lacasa, con la consecuente disminución de la intensidad de corriente.

Para la lacasa de *T. hirsuta* unida covalentemente a un electrodo modificado de grafito, las señales máximas se obtuvieron entre 40-45 °C (figura 4.21.a). También se determinó que a partir de esa temperatura la estabilidad de la medida disminuye, posiblemente debido a la desnaturalización del enzima a altas temperaturas, como indica la disminución de corrientes catalíticas en los CA realizados a distintas temperaturas (figura 4.21.b).

Para los experimentos de medida de actividad electrocatalítica se eligió una temperatura de 27 °C, por encima de la temperatura ambiente del laboratorio (~25 °C) para permitir su termoestabilización, pero sin ser una temperatura demasiado elevada evitando así la pérdida excesiva de disolvente en las medidas de larga duración. Una temperatura de 27 °C se ha considerado adecuada para las medidas, puesto que la

actividad de la enzima es un 85 % del máximo y su estabilidad a dicha temperatura es alta (figura 4.21).

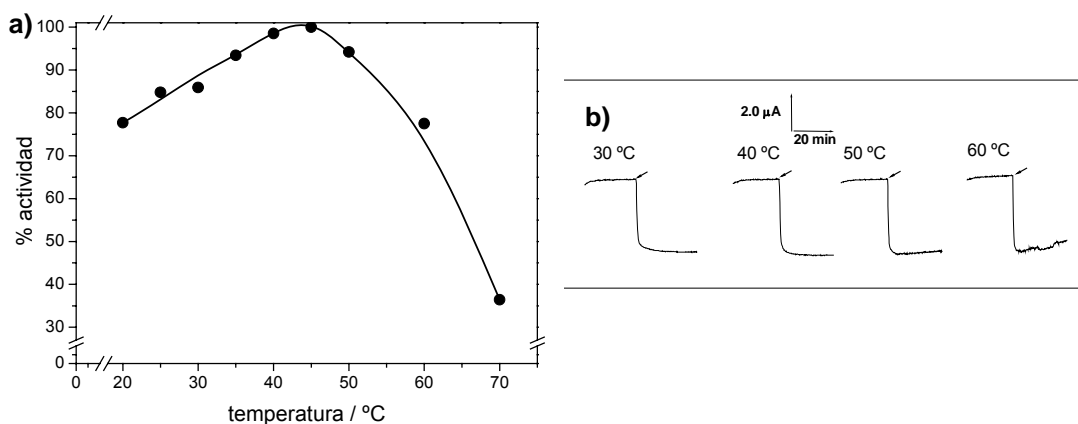


Figura 4.21. Variación de la actividad de la lacasa *T. hirsuta* unida covalentemente por enlace amida a un electrodo LDG modificado con una monocapa de aminofenilos. **a)** Variación de la actividad en función de la temperatura. **b)** Variación de la estabilidad de la medida electroenzimática (en modo de CA) en función de la temperatura. La medida de CA se inicia bajo nitrógeno, pasando posteriormente a borboteo de oxígeno en el momento marcado por la flecha.

4.2.3.3. Efecto del potencial redox

El potencial elegido para las cronoamperometrías fue aquel más positivo en el cual se obtuvo una alta corriente de reducción de O_2 , ya que es el requisito fundamental para el cátodo de una pila de combustible. Los primeros experimentos en voltamperometría cíclica, llevados a cabo con la enzima inmovilizada en condiciones no optimizadas, no revelaron una onda clara en la que se pueda determinar fácilmente un plató (figura 4.22.a). Sin embargo, experimentos hechos en cronoamperometría, variando el potencial aplicado al electrodo, sí demostraron un plató entre +300 y +100 mV (figura 4.22.b). Con estas medidas de CA también se comprobó que la estabilidad de la medida era independiente del potencial aplicado. En base a estos resultados, se estableció un potencial de medida de +200 mV para las CA.

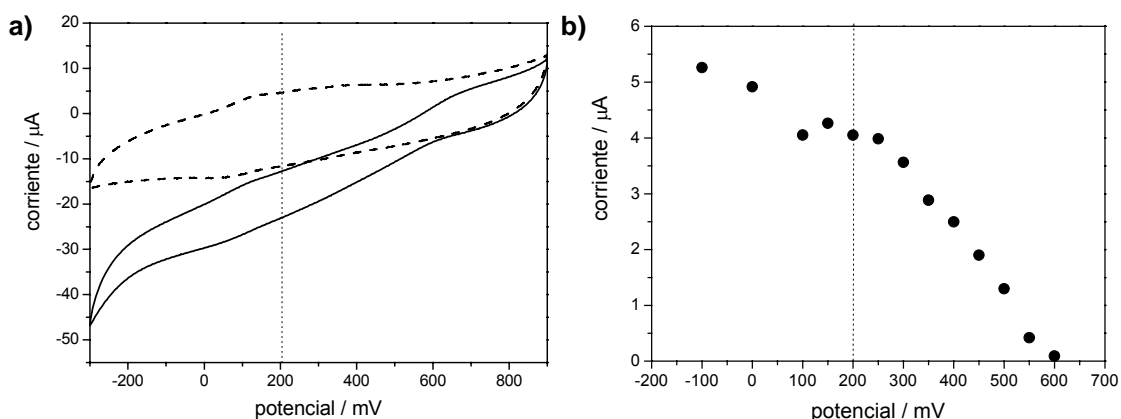


Figura 4.22. Respuesta de un electrodo de LDG funcionalizado con una monocapa de aminofenilos a la que ha unido covalentemente mediante enlace amida la enzima *T. hirsuta*. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM NaClO₄ 100 mM pH 4,5 a una temperatura de 27 °C. **a)** VC bajo borboteo de nitrógeno (---) y bajo borboteo de oxígeno (—). **b)** Variación de la señal en CA en función del potencial aplicado. En cada medida el electrodo se estabilizó al potencial aplicado durante 30 minutos en la disolución gaseada con argón; posteriormente se borboteó oxígeno en la disolución, tomando el valor de la corriente a los 30 minutos.

4.2.4. Optimización de las condiciones de inmovilización de enzima lacasa mediante enlace amida sobre electrodos de carbono funcionalizados

La optimización de las condiciones de inmovilización de la enzima lacasa en la superficie de carbono funcionalizada se llevó a cabo en los electrodos LDG, puesto que presentaron mejores corrientes catalíticas de reducción de O₂, tanto de forma directa como mediada.

El método de inmovilización por unión covalente empleado fue mediante formación de enlace amida por reacción entre grupos amino de la monocapa y residuos carboxílicos del enzima activados con NHS y EDC. Estudios previos realizados en el grupo de trabajo con una enzima hidrogenasa habían demostrado que esta estrategia de inmovilización covalente permite la orientación de la enzima en el electrodo a través de fuerzas electrostáticas⁸⁴. La lacasa de *T. hirsuta* presenta un punto isoelectrico de $4,2 \pm 0,1$ ⁹¹, por lo que es de esperar atracciones electrostáticas entre los grupos aminos, cargados positivamente mayoritariamente a pH inferior a 7⁸⁴, y las moléculas de lacasa, que tienen una carga neta negativa a pH superior a 4,2. Además, la estructura

cristalográfica de la lacasa *T. versicolor*, que presenta gran analogía con la *T. hirsuta*, revela un bolsillo cargado negativamente alrededor del centro T1, formado por residuos carboxílicos no protonados a valores superiores a pH 4⁷⁹, lo que podría favorecer la orientación a través del centro T1, posibilitando la transferencia directa enzima-electrodo a través de este centro redox.

No ha sido posible medir directamente la cantidad de enzima inmovilizada en la superficie, ya que las señales electroquímicas debidas a los centros redox de la lacasa en condiciones no catalíticas no tuvieron la intensidad suficiente para realizar determinaciones cuantitativas (discutido en el apartado 4.2.5.3). Sin embargo, hay que tener en cuenta que sólo cuando la lacasa se encuentra orientada de forma adecuada, con el centro T1 cerca del electrodo, se mide corriente catalítica directa (CCD) de reducción de oxígeno (discutido en el apartado 4.2.5.3), por lo que la intensidad de esta corriente catalítica depende de la cantidad de moléculas de lacasa inmovilizadas activas y correctamente orientadas. Por otra parte, la señal obtenida al añadir mediador al medio depende de la cantidad total de enzima activa inmovilizada, ya que en este caso todas las lacasas activas inmovilizadas en el electrodo contribuyen a la corriente catalítica mediada (CCM) independientemente de su orientación. Por lo tanto, la relación entre CCD y CCM nos da una idea del grado de orientación de las lacasas en el electrodo.

4.2.4.1. Unión covalente a electrodos modificados con una monocapa de aminofenilos/hidroxilaminos

4.2.4.1.1. Efecto de la fuerza iónica

La variación de la corriente electrocatalítica de reducción de oxígeno, debida a la enzima inmovilizada en el electrodo, en función de la fuerza iónica del medio durante la inmovilización es indicativa de la influencia de fuerzas electrostáticas en la orientación del enzima en el electrodo. En la figura 4.23 se recogen las distintas respuestas cuando la enzima se inmoviliza sobre el electrodo a baja fuerza iónica (tampón fosfato 10 mM) y a alta fuerza iónica (tampón fosfato 10 mM conteniendo 1 M de NaClO₄). Como se aprecia, cuando la inmovilización se lleva a cabo a alta fuerza iónica la CCM es menor, esto es, el recubrimiento de enzima activa es menor, lo que indica que la reacción de inmovilización se dificulta a alta fuerza iónica. Pero también la relación CCD/CCM disminuye unas dos veces a alta fuerza iónica, por lo podemos concluir que la

orientación de la enzima respecto la superficie del electrodo se ve influida por fuerzas electrostáticas.

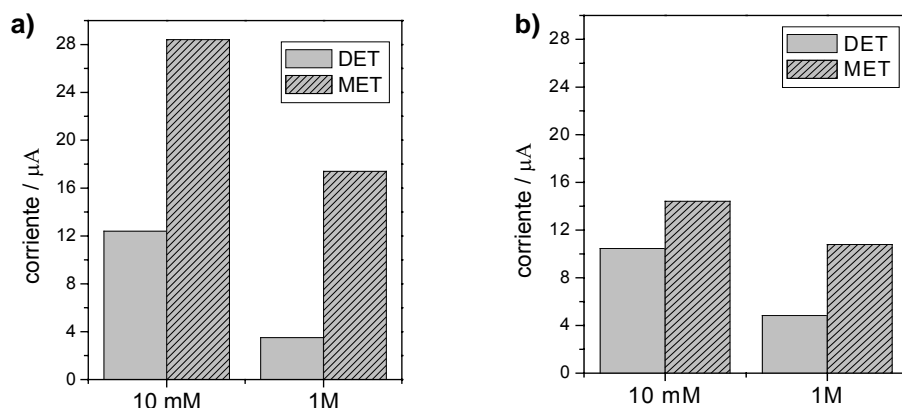


Figura 4.23. CCD y CCM obtenidas con un electrodo LDG funcionalizado con una monocapa de aminofenilos/hidroxilaminofenilos en la que se ha inmovilizado covalentemente *T. hirsuta* usando NHS y EDC en tampón fosfato 10 mM en ausencia o en presencia de NaClO₄ 1 M. Las corrientes CCD y CCM se midieron en el CA a 200 mV. **a)** pH 6,0; **b)** pH 8,0

De estos experimentos se concluye que la fuerza iónica afecta al proceso de inmovilización y orientación de la enzima, favoreciendo las bajas fuerzas iónicas la inmovilización orientada por el centro T1. Sin embargo, otro tipo de interacciones también deben favorecer esta orientación, puesto que aún a alta fuerza iónica y alto valor de pH, al cual es de esperar que los grupos amino de la monocapa no se encuentren protonados⁸⁴, se obtiene CCD. Otras posibles interacciones podrían ser puentes de hidrógeno entre residuos aspartato, histidina o glicina cercanos al centro T1 de la lacasa y los grupos amino de la monocapa, propuestos previamente por otros autores a partir de estructuras cristalográficas de lacasas con sustratos orgánicos^{15, 40}, o interacciones hidrofóbicas entre los anillos aromáticos de la monocapa y los de aminoácidos (tirosina, triptófano y fenilalanina) que forman parte de la cavidad del centro T1^{15, 18, 66}.

4.2.4.1.2. Efecto de la cantidad de enzima

La cantidad de lacasa disponible durante la inmovilización también afecta a la corriente obtenida. En la figura 4.24 se recogen las corrientes catalíticas directa (CCD) y mediada (CCM) obtenidas cuando distintas cantidades de enzima se inmovilizan sobre el electrodo modificado. Se puede apreciar cómo la CCM aumenta al aumentar la cantidad de enzima, aunque su aumento a partir de 5 μg de lacasa es pequeño, lo que

indica que a concentraciones bajas del enzima ya casi se ha alcanzado el máximo recubrimiento de lacasa. Por otro lado, la CCD alcanza un máximo a valores relativamente bajos de enzima, entre 3,6 y 5,0 μg , sufriendo a concentraciones mayores una ligera disminución. Este fenómeno puede deberse a la inmovilización de multicapas de enzima, que podrían inactivar las lacasas más cercanas a la superficie, disminuyendo de esta forma la CCD.

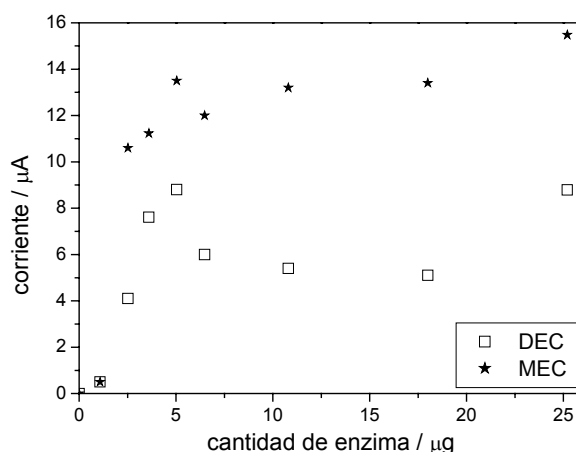


Figura 4.24. Variación de la corriente obtenida, tanto directa como mediada, en función de la cantidad de enzima disponible durante la inmovilización. CCD y CCM obtenidas al inmovilizar la lacasa en un electrodo LDG funcionalizado con monocapa de aminofenil usando tampón fosfato 10 mM pH 8,0. Las corrientes se obtuvieron en CA a 200 mV.

4.2.4.1.3. Efecto del pH

Como ya se apreciaba en la figura 4.23, el pH al que se realiza la inmovilización de la lacasa afecta a la corriente obtenida, debido seguramente a cambios en la carga de los grupos funcionales de la monocapa y de la lacasa.

Se llevó a cabo un estudio más detallado para determinar el pH óptimo al que debería realizarse la inmovilización de la lacasa. En este caso se partió de la disolución madre de enzima, se diluyó diez veces en tampón fosfato 10 mM al pH deseado y se añadió la mezcla de NHS y EDC, ambas disueltas en el mismo tampón que el usado para diluir la lacasa. Puesto que era preciso utilizar un tampón de baja fuerza iónica para favorecer las interacciones entre lacasa y electrodo (como se ha discutido en el apartado anterior), el pH de las disoluciones que contenían NHS y EDC disminuía respecto al pH del tampón y, por lo tanto, la inmovilización del enzima tenía lugar a un pH más ácido. No obstante, se comprobó que, entre los pHs 3,0 y 9,5, existe una relación lineal entre el

pH usado para las diluciones y el pH real al que se produce la inmovilización, como puede apreciarse en la figura 4.25.

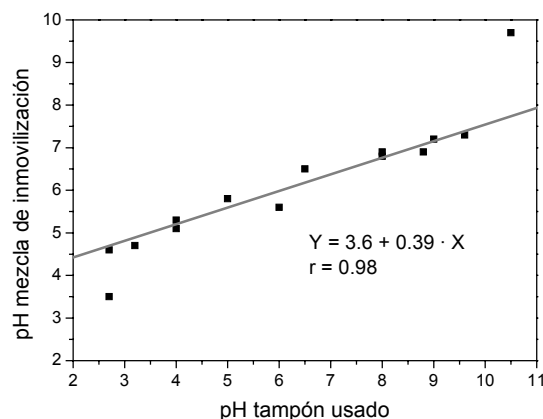


Figura 4.25. Relación entre el tampón usado para las diluciones y el pH real de la mezcla de inmovilización de la enzima.

En la figura 4.26 se representan las señales obtenidas para diferentes pHs de inmovilización. Tanto la CCM como la CCD presentan mayores valores a pHs ácidos. Para valores de pH menores de 7, la relación CCD/CCM es óptima cuando el pH de inmovilización es 5,1 (tabla 4.14). A este valor de pH se estima que los grupos carboxílicos de la lacasa (presentes en los aminoácidos glutámicos y aspárticos) están mayoritariamente desprotonados⁷⁹, mientras que las aminas de la monocapa se encontrarán mayoritariamente protonadas. Por tanto, cabe concluir que las interacciones electrostáticas entre residuos con carga negativa de la lacasa y grupos cargados positivamente del electrodo favorecen la inmovilización con una orientación adecuada para la transferencia electrónica directa en el intervalo de pH 4-7.

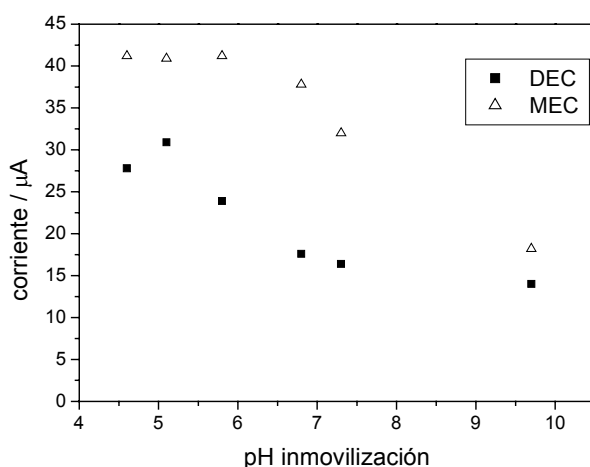


Figura 4.26. Variación de la corriente obtenida, tanto de forma directa como mediada, en función del pH de inmovilización. Las corrientes se obtuvieron en CA a 200 mV.

pH inmov	4,6	5,1	5,8	6,8	7,3
CCD/CCM	0,68	0,76	0,58	0,47	0,51

Tabla 4.14. Relación CCD/CCM obtenida al inmovilizar enzima lacasa en un electrodo LDG funcionalizado con monocapa de aminofenil a distintos pHs.

4.2.4.1.4. Estudio simultáneo de la influencia del pH y la cantidad de enzima durante la inmovilización mediante la metodología del diseño de experimentos.

Aunque las variables pH y cantidad de enzima durante la inmovilización ya habían sido estudiados individualmente, se procedió a un estudio conjunto a través de la metodología del diseño de experimentos, puesto que de esta forma es posible estudiar el efecto conjunto de ambos factores sobre la respuesta y, además, determinar la tendencia que siguen⁵.

Para el estudio se llevó a cabo un diseño 2^2 central compuesto, que consiste en un diseño factorial 2^k (de primer orden) aumentado por 2 k puntos axiales ($0 \pm \alpha$, $0, \dots$, 0), (0 , $0 \pm \alpha, \dots$, 0) y n_c puntos centrales (figura 4.27). Los puntos axiales deben ser elegidos de tal forma que el diseño sea rotatable, esto es, que la respuesta sea invariante por rotaciones en el espacio de los experimentos, obteniendo así estimaciones igualmente precisas en todas direcciones.

En este caso las variables experimentales estudiadas fueron la cantidad de lacasa disponible durante la inmovilización en μg (C) y el pH de inmovilización, evaluando la intensidad de corriente catalítica de reducción de O_2 obtenida, tanto de forma directa (CCD) como mediada (CCM), como variable respuesta. Para cada factor a optimizar se eligieron dos niveles, alto y bajo, de tal forma que el diseño construido abarcó cinco niveles para cada variable. En la elección de los niveles se tuvo en cuenta el intervalo de linealidad entre el pH del tampón usado y el pH real de inmovilización. De esta forma los valores seleccionados para los niveles alto (+), bajo (-) y punto central (0) de cada parámetro fueron los siguientes,

pH(+) 8,0	pH(-) 4,0	pH(0) 6,0
C(+) 17	C(-) 3,0	C(0) 10

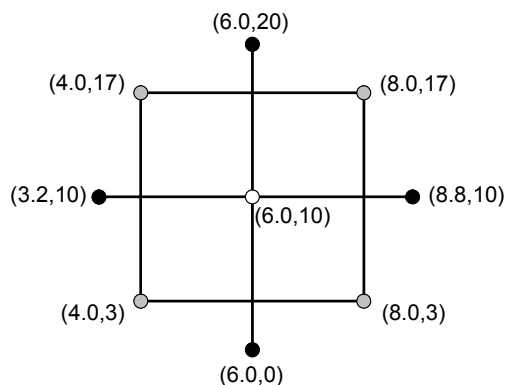


Figura 4.27. Puntos experimentales (pH, μg de enzima) evaluados en el diseño central compuesto.

Los experimentos obtenidos tras la aplicación del diseño se recogen en la figura 4.27. Se realizaron tres réplicas del punto central para estimar el error residual. Se consideró como variable el pH usado para realizar las disoluciones, aunque posteriormente se calculó el pH real de inmovilización para analizar las posibles interacciones electrostáticas durante la inmovilización. La tabla 4.15 recoge las intensidades de corriente catalítica directa (CCD) y mediada (CCM) obtenidas para cada punto experimental, así como el pH real al que se produjo la inmovilización.

pH tampón	pH inmovilización	C enzima (μg)	CCD (μA)	CCM (μA)
4,0	5,3	3,0	-19,2	-31,5
8,0	6,9	3,0	-15,2	-18,8
4,0	5,3	17,0	-14,2	-29,3
8,0	6,9	17,0	-9,9	-22,7
3,2	4,7	10,0	-13,6	-38,5
8,8	7,0	10,0	-11,8	-24,2
6,0	5,6	0,0	0,0	0,0
6,0	5,6	20,0	-13,1	-27,9
6,0	5,6	10,0	-17,9	-34,0
6,0	5,6	10,0	-21,0	-37,4
6,0	5,6	10,0	-14,9	-28,6

Tabla 4.15. Datos experimentales utilizados en el análisis de las variables experimentales a través del diseño de experimentos para los electrodos LDG funcionalizados con una monocapa de aminofenilos sobre los que se ha inmovilizado covalentemente mediante enlace amida la

lacasa *T. hirsuta*. Cada punto corresponde a un electrodo realizado en un día diferente. Las corrientes se obtuvieron en CA a 200 mV.

Los resultados del diseño se presentan en forma de análisis de varianza (ANOVA) (tabla 4.16). Dicho análisis divide la variabilidad de la variable respuesta en fragmentos individuales para cada efecto y, seguidamente, analiza el significado estadístico de cada uno, comparando la media de cuadrados con una estimación del error experimental. Una interpretación sencilla para determinar si los efectos son significativos es su valor de P_{actual} . Cuando P_{actual} es inferior a 0,05 indica que el efecto es significativamente distinto de cero a un nivel de confianza del 95%, siendo influyente en la variable respuesta. El fallo de ajuste compara la variabilidad del modelo con la variabilidad entre replicas de los experimentos, dando una idea de la adecuación de los datos para describirlos mediante una función de segundo grado. Si P_{actual} del fallo de ajuste es menor de 0,05 indica que no puede usarse una función de segundo grado, sino que debe usarse un modelo más complejo. El coeficiente R^2 define la proporción de variabilidad de los datos explicada por el modelo de regresión construido con los datos experimentales.

EFFECTO	S.C.	G.L.	M.C.	F_{exp}	P_{actual}
A:pH	119,285	1	119,285	10,14	0,0861
B:Cenzima	216,059	1	216,059	11,00	0,0802
AA	0,354715	1	0,354715	0,02	0,9054
AB	8,38102	1	8,38102	0,43	0,5807
BB	451,396	1	451,396	22,97	0,0409*
Fallo ajuste	193,023	3	64,3409	3,27	0,2427
Error puro	39,2966	2	19,6483		
Total_{corr.}	1142,43	10			
R^2	79,6644%				

Tabla 4.16. ANOVA de los datos de la tabla 4.15 para CCM. S.C., suma de cuadrados; G.L., grados de libertad; M.C., media de cuadrados; $F_{\text{exp}} = MC_{\text{factor}}/MC_{\text{error}}$; P_{actual} , nivel de probabilidad; * Factores significativos a $\alpha=0,05$.

En el caso del análisis CCM, puede observarse en la tabla 4.16 que tanto el pH como sus interacciones no son efectos significativos, siendo el modelo adecuado para el

ajuste de los datos puesto que no existe fallo de ajuste ($P_{\text{actual}} > 0,05$). En la figura 4.28 puede observarse la influencia de los principales efectos en la variable respuesta. La tendencia observada es similar a la obtenida estudiando las variables de forma independiente (figuras 4.24 y 4.26), puesto que, como hemos visto, no existen interacciones significativas entre ellas.

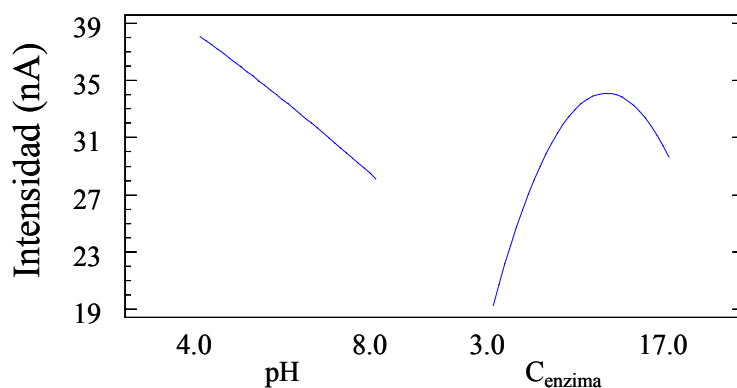


Figura 4.28. Análisis del efecto de las variables experimentales sobre la variable respuesta CCM. La intensidad de corriente se expresa en valor absoluto.

La superficie de respuesta obtenida en el ajuste de los datos experimentales nos ofrece la tendencia de la corriente catalítica mediada en todo el rango de las variables estudiadas (figura 4.29).

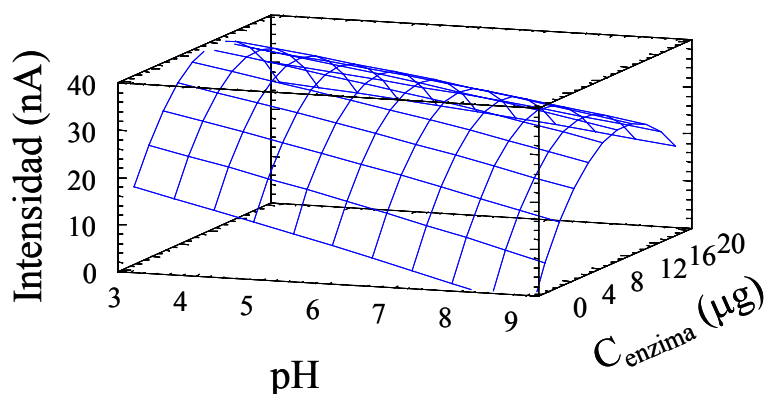


Figura 4.29. Superficie de respuesta para la CCM obtenida en la optimización de las variables experimentales que afectan a la inmovilización covalente de la lacasa sobre monocapa de aminofenilos mediante la formación de enlace amida. La intensidad de corriente se expresa en valor absoluto.

Teniendo en cuenta ambas figuras, se tomaron como valores óptimos de las variables experimentales una cantidad de enzima de 11 µg y un pH de 3,2, que a su vez

coinciden con el óptimo calculado por el programa maximizando la respuesta en la región estudiada.

Resultados muy similares se obtuvieron al analizar la respuesta obtenida directamente, CCD, obteniendo la máxima respuesta a los valores de 10,8 μg para la concentración de enzima y pH 3,2.

El pH óptimo teórico obtenido mediante este estudio corresponde a un pH real de inmovilización de 4,7, similar al que se obtuvo en el apartado anterior mediante un análisis independiente (pH de inmovilización 5,1). En ambos casos se encuentra ligeramente por encima del punto isoeléctrico de la enzima, 4,2⁹¹, por lo que es de esperar que en las condiciones óptimas de inmovilización la carga neta de la enzima sea negativa. Además, a ese pH la monocapa se debe encontrar protonada, el pK_a de los grupos aminos se estima en torno a 7⁸⁴, por lo que cabe la posibilidad de que las fuerzas electrostáticas favorezcan la inmovilización. Sin embargo, como ya se ha comentado, otros factores también deben contribuir a la orientación, puesto que incluso a altos valores de pH, cuando es de esperar que la monocapa no se encuentre cargada positivamente, las corrientes obtenidas presentan un valor elevado.

En base a estos experimentos, para el protocolo de inmovilización de la enzima se estableció el uso de tampón fosfato 10 mM pH 3,2 y una cantidad de enzima de 10 μg .

4.2.4.2. Unión covalente a electrodos modificados con una monocapa de aminofenoles

4.2.4.2.1. Estudio simultáneo de la influencia del pH y la cantidad de enzima durante la inmovilización mediante la metodología del diseño de experimentos.

Los puntos experimentales se eligieron de la misma forma que se ha descrito para la monocapa de aminofenilos (apartado 4.2.4.1.4). Los experimentos se realizaron considerando para los puntos del ajuste el pH del tampón que se usó para las diluciones. La tabla 4.17 recoge las intensidades de corriente catalíticas directas (CCD) y mediadas (CCM) para cada punto experimental, así como el pH real al que se produjo la inmovilización.

pH tampón	pH inmovilización	C enzima (μg)	CCD (μA)	CCM (μA)
4,0	5,3	3,0	-14,8	-27,3
8,0	6,9	3,0	-2,8	-6,9
4,0	5,3	17,0	-10,8	-33,7
8,0	6,9	17,0	-12,0	-27,1
3,2	4,7	10,0	-20,2	-48,3
8,8	6,9	10,0	-10,9	-22,8
6,0	5,6	0,0	0,0	0,0
6,0	5,6	20,0	-9,5	-37,8
6,0	5,6	10,0	-10,3	-31,1
6,0	5,6	10,0	-15,8	-43,7
6,0	5,6	10,0	-13,7	-36,0

Tabla 4.17. Puntos experimentales obtenidos para los electrodos LDG funcionalizados con una monocapa de aminofenoles sobre los que se ha inmovilizado covalentemente la lacasa de *T. hirsuta* mediante formación de enlace amida. Cada punto corresponde a un electrodo realizado en un día diferente. Las intensidades de corriente se midieron en CA a +200 mV.

EFEECTO	S.C.	G.L.	M.C.	F _{exp}	P _{actual}
A:pH	497,109	1	497,109	12,32	0,0724
B:Cenzima	801,147	1	801,147	19,86	0,0468*
AA	13,75	1	13,75	0,34	0,6184
AB	47,61	1	47,61	1,18	0,3908
BB	551,839	1	551,839	13,68	0,0660
Fallo ajuste	124,528	3	41,5272	1,03	0,5272
Error total	80,6867	2	40,3433		
Total _{corr.}	2114,19	10			
R ²	90,2909%				

Tabla 4.18. ANOVA de los datos de la tabla 4.17. S.C., suma de cuadrados; G.L., grados de libertad; M.C., media de cuadrados; F_{exp}=MC_{factor}/MC_{error}; P_{actual}, nivel de probabilidad; *Factores significativos a α=0,05.

El análisis de varianza (ANOVA), para CCM de este diseño experimental se describe en la tabla 4.18. Puede observarse que la cantidad de enzima influye en el valor de la respuesta ($P_{\text{actual}} < 0,05$) y el modelo se ajusta a los datos observados en un nivel de confianza del 95,0% (fallo de ajuste con $P_{\text{actual}} > 0,05$, con valor de R^2 superior al 90%), por lo que se ha considerado un ajuste válido.

En la representación de contornos de las superficies de respuesta a las que se ajustan los datos se aprecia claramente la presencia de un máximo cuyos valores, para el caso CCM, son pH 3,2 y 11,8 μg para la cantidad de enzima (figura 4.30).

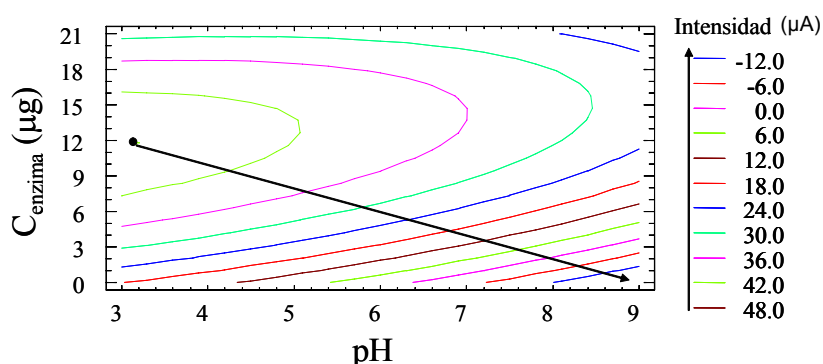


Figura 4.30. Representación de los contornos de la respuesta estimada obtenida en la optimización de las variables experimentales que afectan a la inmovilización covalente mediante formación de enlace amida del enzima lacasa sobre monocapa de aminofenoles. La flecha representa la dirección en que decrece el valor absoluto de la intensidad de corriente respuesta (CCM).

En el estudio análogo realizado para CCD se obtuvo un resultado similar, siendo los valores del máximo pH 3,2 y cantidad de enzima 8,1 μg .

En base a estos datos se establecieron las condiciones óptimas para el protocolo de inmovilización: tampón fosfato 10 mM pH 3,2 y cantidad de enzima 10 μg .

Cabe destacar que estos resultados son muy similares a los obtenidos para la monocapa de aminofenilos, por lo que se puede concluir que los factores que influyen durante la inmovilización deben ser los mismos. Este hecho experimental no es sorprendente ya que el pK_a de los grupos amino de ambas monocapas deben ser similares¹ y ambas monocapas tienen anillos aromáticos que pueden favorecer interacciones atractivas de orbitales π resonantes con anillos aromáticos de aminoácidos tirosina, triptófano y fenilalanina próximos al centro T1 de la lacasa, y también presentan grupos funcionales capaces de establecer puentes de hidrógeno.

4.2.5. Propiedades electrocatalíticas de la lacasa de Trametes hirsuta inmovilizada covalentemente en electrodos de carbono mediante enlace amida

4.2.5.1. Experimentos control

Mediante experimentos control, en ausencia de lacasa inmovilizada, se demostró que las corrientes catalíticas obtenidas en los electrodos de carbono modificados eran debidas exclusivamente a la presencia de enzima lacasa inmovilizada en ellos. En CA a +200 mV no se observó ningún cambio de la intensidad de corriente de fondo cuando se pasó de una disolución anaerobia a una aerobia ni para el electrodo desnudo ni cuando estaba funcionalizado con las monocapas en ausencia de lacasa. En esas condiciones tampoco se detectó ningún cambio en la corriente de fondo cuando se añadieron al medio el sustrato ABTS o el inhibidor fluoruro. Se puede decir, por tanto, que ni el electrodo desnudo ni las monocapas catalizan la reducción de oxígeno a ese potencial redox. Además, el ABTS, que se añade en su forma reducida, no es capaz de oxidarse al potencial aplicado de 200 mV, ya sea en el electrodo desnudo o funcionalizado (figura 4.31). Por lo tanto, las corrientes detectadas se deben exclusivamente a la catálisis enzimática de reducción de O₂.

También se realizó un experimento control en el cual la lacasa se encontraba en disolución en vez de inmovilizada en el electrodo. En las condiciones de medida se observó que la presencia de enzima en la disolución producía reducción catalítica de ABTS en el electrodo en presencia de O₂ (figura 4.31). Sin embargo, la corriente obtenida cuando se añade una cantidad de enzima equivalente a la mitad de la utilizada durante el proceso de inmovilización es despreciable ($< 1 \mu\text{A}$) respecto a la obtenida cuando la enzima está inmovilizada en el electrodo ($\sim 45 \mu\text{A}$, figura 4.32). Por lo tanto, podemos considerar que, en el último caso, toda la CCM es debida a la actividad de la lacasa inmovilizada covalentemente en el electrodo, despreciando posibles contribuciones de lacasa que hubiera difundido hacia la disolución.

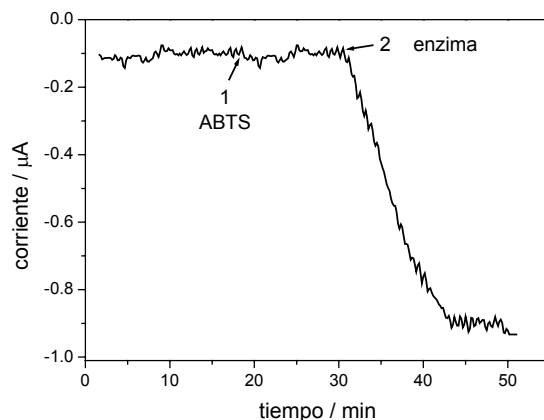


Figura 4.31. Intensidad de corriente de reducción obtenida en el electrodo LDG funcionalizado con una monocapa de aminofenilos. La medida se llevó a cabo en CA a 200 mV bajo borboteo de O_2 . A tiempo 1 se añadió a la celda ABTS hasta una concentración de 0,2 mM, y a tiempo 2 se añadieron 5,5 μg de enzima.

4.2.5.2. Reducción electroenzimática de O_2 con diferentes superficies electródicas

En la tabla 4.19 se recogen las intensidades de corrientes obtenidas en las diferentes superficies electródicas probadas: carbón vitrificado (GC), carbono pirolítico (PG), grafito espectroscópico (SPG) y grafito de baja densidad (LDG). La inmovilización se llevó a cabo en las condiciones de inmovilización optimizadas anteriormente para los electrodos LDG: tampón fosfato 10 mM pH 3,2 y cantidad de enzima 10,0 μg .

Electrodo	aminofenilos			Aminofenoles		
	CCD $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	CCM $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	CCD/CCM	CCD $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	CCM $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	CCD/CCM
GC	0	-0,9	/	0	-6,7	/
PG	-0,6	-22,1	0,03	-0,2	-12,8	0,02
LDG	-332,7	-588,1	0,57	-288,2	-690,1	0,42
SPG	-157,1	-281,4	0,56	-192,8	-368,0	0,52

Tabla 4.19. Corrientes electrocatalíticas de reducción de oxígeno obtenidas en distintas superficies de carbón funcionalizadas con monocapas de aminofenilos o aminofenoles sobre las que se inmovilizó covalente lacasa de *T. hirsuta* en las condiciones óptimas de inmovilización descritas anteriormente. Para su comparación se presentan las densidades de corriente obtenidas considerando el área geométrica de los electrodos.

Como se observa en la tabla, sólo se obtienen corrientes relevantes, tanto directas como mediadas, al usar los electrodos LDG y SPG, siendo en estos casos en los que se consigue además una mejor relación CCD/CCM. Las mayores corrientes obtenidas pueden explicarse debido a la mayor rugosidad de los electrodos LDG y SPG (ver apartado 4.2.1.1). Sin embargo, el aumento de corriente es mucho mayor que el aumento del área microscópica de los electrodos LDG y SPG respecto a los electrodos GC y PG, por lo que es posible que el menor tamaño de poro de los electrodos GC y PG pulidos¹⁷ dificulte la adsorción de enzima, ya sea porque la lacasa es más grande que el tamaño de poro o porque se adsorbe cerca de la superficie del poro impidiendo la entrada de más enzima, obteniendo así una superficie de modificación menor a la electroactiva. Por otro lado, en los electrodos LDG y SPG, con un mayor tamaño de poro (ver apartado 4.2.1.2), todo el área electroactiva será accesible para la lacasa. Un resultado similar han reportado Qiu y cols.⁸¹ en electrodos porosos de oro, en los que la corriente obtenida cuando el tamaño de poro era de 10-20 nm era inferior a las corrientes obtenidas con tamaños de poro superiores. Además, parece ser que dicha estructura porosa favorece la transferencia electrónica directa entre la lacasa y el electrodo, obteniendo así una mayor relación CCD/CCM. De hecho, son muy pocos los trabajos que reportan CCD en electrodos como el PG, entre ellos el grupo de Armstrong¹⁸ pero, incluso en este caso, sólo obtienen CCD cuando dichos electrodos se encuentran funcionalizados con antraceno, no observando catálisis al usar otras monocapas¹⁸.

Entre los electrodos LDG y SPG, las mayores corrientes se obtuvieron usando los electrodos LDG, de acuerdo con su mayor área electroquímica, por lo que fueron éstos los que se utilizaron en experimentos posteriores. En cuanto al uso de una u otra monocapa, no se observaron grandes diferencias entre ellas, aunque la orientación de la lacasa es ligeramente más favorable en la monocapa de aminofenilos (mayor relación CCD/CCM). En la figura 4.32 pueden verse los voltamperogramas cíclicos y cronoamperogramas obtenidos con los electrodos de LDG. La desviación estándar de las corrientes obtenidas es del 15%, calculada para cinco electrodos LDG modificados en diferentes días.

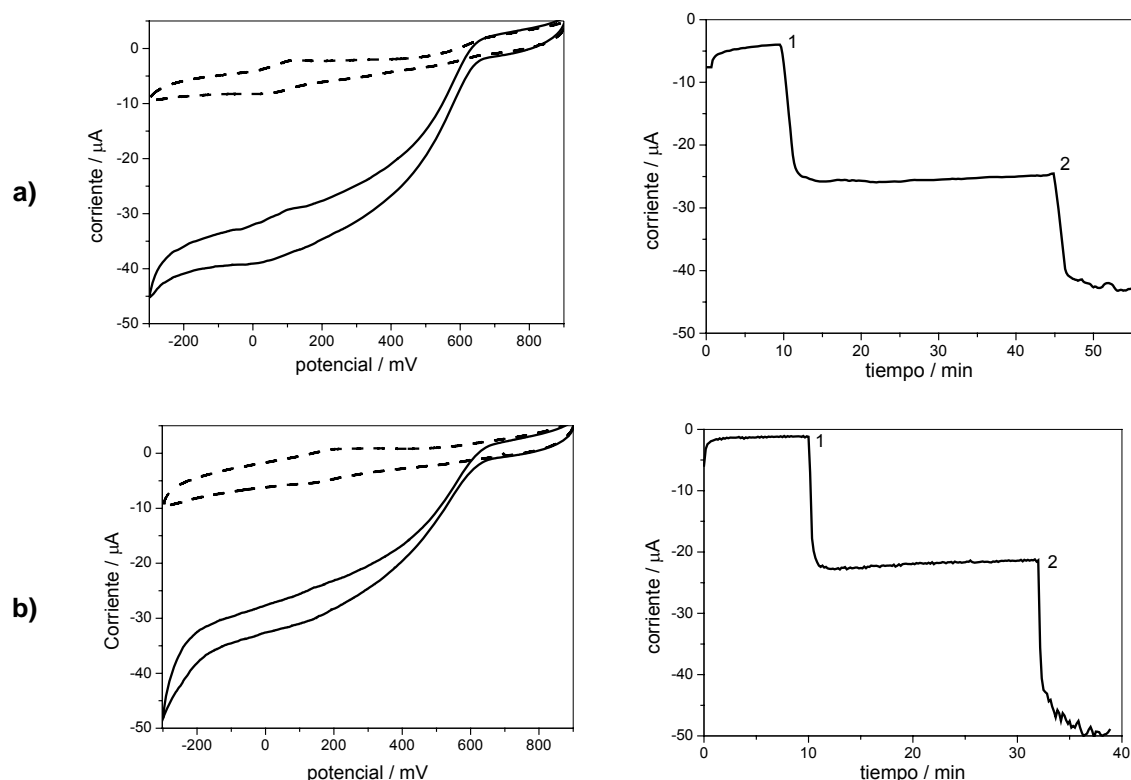


Figura 4.32. VC (izquierda) y CA (derecha) obtenidos cuando se lleva a cabo la inmovilización covalente de *T. hirsuta*, en las condiciones óptimas descritas en el texto, sobre electrodos LDG funcionalizados con una monocapa de aminofenilos (a) o de aminofenoles (b). En los VC se representan las CCD obtenidas bajo atmósfera de nitrógeno (---) o de oxígeno (—). En los CA la medida se inició bajo borboteo de nitrógeno, pasando en el tiempo 1 a borboteo oxígeno. En el tiempo 2 se añadió el mediador ABTS a la disolución de medida hasta una concentración 0,2 mM.

Si comparamos la CCD obtenida con los electrodos LDG con los reportados en la bibliografía (tabla 4.20) observamos que la densidad de corriente obtenida en este trabajo es de las más altas reportadas por el momento en ausencia de mediadores redox, siendo similar a la reportada por Blanford y cols.¹⁸, en la que también se inmoviliza orientadamente la lacasa. Usando nanotubos de carbono (CNTs)^{34, 60, 105}, que aportan un área microscópica muy alta permitiendo un gran recubrimiento de moléculas de lacasa por área geométrica de electrodo, se obtienen resultados similares, debido a que, a pesar del mayor recubrimiento de lacasa, en estos casos la orientación es al azar y no está optimizada la CCD. Usando un aerogel de carbón^{50, 99} se obtienen mayores corrientes, posiblemente debido a que también en este caso el área microscópica es muy alta, pero el recubrimiento de lacasa no orientada es mayor que con los CNTs, seguramente por la formación de multicapas de enzima en la matriz del gel.

lacasa	electrodo	funcionalización	método inmovilización	CCD $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	Referencia
<i>T. hirsuta</i>	HOPG	no	membrana de diálisis	-14	Shleev 2004 ⁹¹
<i>T. versicolor</i>	GCE	CNTs	entrecruzamiento	-25	Zheng 2008 ¹⁰⁵
<i>T. hirsuta</i>	SPG	no	adsorción	-120	Christenson 2004 ²⁶
<i>T. sp.</i>	papel carbon	no	adsorción	-150	Kamitaka 2007 ⁵⁰
<i>Cerrena unicolor</i>	SPG	no	adsorción	-190	Shleev 2004 ⁹¹
<i>T. versicolor</i>	microelectrodos de carbono	CNTs	entrecruzamiento	-300	Li 2008 ⁶⁰
<i>T. hirsuta</i>	LDG	aminofenilos	covalente	-430	presente tesis
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	PG	antraceno	adsorción	-500	Blanford 2007 ¹⁸
<i>T. versicolor</i>	óxido de estaño/indio	CNTs	adsorción multicapas	-550	Deng 2008 ³⁴
<i>T. sp.</i>	papel carbon	aerogel de carbon	adsorción	-4000	Kamitaka 2007 ⁵⁰
<i>T. sp.</i>	papel carbon	aerogel de carbon	adsorción	-10000	Tsujimura 2007 ⁹⁹

Tabla 4.20. DEC's reportadas en la bibliografía para lacasas de alto potencial inmovilizadas en electrodos de carbono. Todas las densidades de corriente han sido calculadas a partir del VC y referidas al área geométrica.

4.2.5.3. Orientación de la lacasa en el electrodo

Como ya se ha comentado, el grado de orientación de las moléculas de lacasa sobre el electrodo se ha calculado considerando la relación entre la CCD, que asumimos asociada a moléculas de lacasa orientadas con el centro T1 hacia el electrodo a una distancia suficiente para que se produzca transferencia directa entre la enzima y el electrodo, y la CCM, asociada al número total de moléculas de lacasa activa inmovilizada sobre la superficie del electrodo.

Para comprobar si la funcionalización del electrodo con grupos amino favorece la orientación de la enzima en el electrodo se realizaron controles en los que el electrodo no se encontraba modificado. Como se aprecia en la tabla 4.21, cuando la enzima se fisisorbió sobre los electrodos LDG desnudos las corrientes obtenidas fueron muy bajas, especialmente en el caso de la CCD. Cuando la enzima se inmovilizó sobre el electrodo funcionalizado las corrientes mejoraron, aún cuando no se produjo enlace covalente a la monocapa. Por lo tanto, la presencia de la monocapa favorece la orientación de la

enzima en el electrodo, dando como resultado una mayor intensidad de corriente directa de reducción de oxígeno catalítica (CCD) y una relación CCD/CCM mayor.

funcionalización	desnudo	aminofenilos		aminofenoles	
inmovilización	FS	FS	EA	FS	EA
CCD μA	- 0.6	- 5.8	- 8.8	- 4.2	- 19.4
CCM μA	- 14.3	- 10.1	- 14.2	- 5.7	- 25.5
CCD/CCM	0.04	0.57	0.62	0.74	0.76

Tabla 4.21. Controles realizados para un electrodo LDG, desnudo y funcionalizado con las monocapas (aminofenilos y aminofenoles). La inmovilización se llevó a cabo usando 4,2 μg de enzima y tampón fosfato 10 mM pH 8,0 por fisisorción (FS) o unión covalente mediante enlace amida (EA). Las corrientes se obtuvieron en CA a 200 mV.

Como se ha mencionada anteriormente, la obtención de CCD es indicativa de que centros redox de la lacasa transfieren directamente electrones con el electrodo, debido a que se encuentran a una distancia adecuada. Cuando la inmovilización se lleva a cabo mediante la formación de enlace amida entre el enzima y el electrodo, la electrocatálisis de reducción del oxígeno se observa a partir de +600 mV *vs.* Ag/AgCl (800 mV *vs.* ENH) (figura 4.32, VC), muy cerca del valor del potencial del centro T1 de la lacasa (780 mV *vs.* ENH)⁹¹. Por lo tanto, se puede concluir que un porcentaje elevado de moléculas de lacasa inmovilizada se encuentran orientadas con el centro T1 dirigido hacia el electrodo. Como ha sido reportado en la bibliografía^{80, 87} es posible observar, midiendo en VC en condiciones anaerobias, el proceso redox de transferencia electrónica entre el electrodo y el centro T1 de la enzima, pudiendo, mediante integración de la señal obtenida, conocer la cantidad de enzima orientada sobre el electrodo. Por ello, se llevaron a cabo experimentos en condiciones estrictamente anaerobias (en cámara anaerobia con concentración de oxígeno < 0,1 ppm) para tratar de cuantificar la cantidad de enzima inmovilizada en el electrodo. Sin embargo, en condiciones totalmente anaerobias no se observó ningún proceso redox (figura 4.34).

Puesto que era posible que la dificultad encontrada para detectar la transferencia directa no catalítica entre el centro T1 y el electrodo mediante medidas de voltamperometría cíclica se debiera a la alta capacitancia que presentaban los electrodos empleados, se realizaron medidas de voltamperometría de onda cuadrada (OSWV), una técnica en la cual se elimina la contribución de la intensidad de corriente capacitiva al

voltamperograma obtenido y, por tanto, aumenta la sensibilidad de las corrientes faradáicas⁸⁶.

En las medidas de OSWV realizadas se observó la aparición de un pico a 477 mV *vs.* Ag/AgCl (677 mV *vs.* ENH), que se hacía más pronunciado al aumentar la concentración de enzima (figura 4.33). El potencial del pico es unos 100 mV menor que el obtenido en la bibliografía para el centro T1 de esta enzima (780 mV *vs.* ENH)⁹¹ pero muy superior al potencial del centro T2/T3 (aprox. 400 mV *vs.* ENH)⁸⁹. Por lo tanto es posible que se trate del centro T1. Sin embargo, no se pudieron llevar a cabo medidas cuantitativas de la cantidad de lacasa conectada al electrodo, debido a la presencia de un pico a 300 mV, asociado a la monocapa, que se solapa con el de la enzima (figura 4.33).

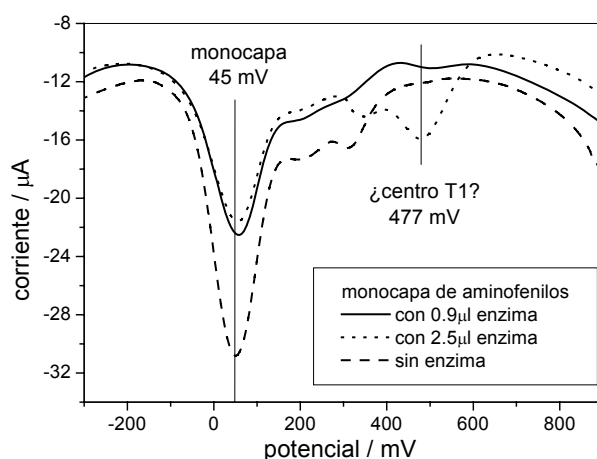


Figura 4.33. OSWV obtenidos tampón acetato pH 4,2, usando una amplitud de 10 mV y una frecuencia de 10 Hz, para un electrodo LDG funcionalizado con monocapa de aminofenilos.

Por otra parte, en la figura 4.33 se observa claramente una disminución del pico a 45 mV, asociado al proceso redox de las hidroxilaminas de la monocapa de aminofenilos, tras la inmovilización de la lacasa. Esto puede ser un indicativo de que las hidroxilaminas se encuentran involucradas en el enlace covalente. Sin embargo, la señal de hidroxilaminas no es estable en el tiempo y, a pesar de que los controles se realizaron en las mismas condiciones y durante el mismo tiempo de reacción, es posible que otros factores, relacionados con la presencia de la enzima, afecten a la estabilidad de las hidroxilaminas y, por tanto, a su señal electroquímica.

En un trabajo anterior de este laboratorio se había observado que, cuando la lacasa se encuentra directamente adsorbida sobre electrodos de oro, es posible la transferencia directa entre el electrodo y el centro T2/T3, dando como resultado una reducción parcial del oxígeno a peróxido de hidrógeno que no se ve afectada por la

presencia de fluoruros en el medio⁸⁰. En esta tesis se ha analizado la posible presencia de peróxido de hidrógeno en la celda de reacción, indicativo de que parte de la lacasa se encontraría orientada por el centro T2/T3. Con los métodos usados (cuyo límite de detección usando un patrón de H_2O_2 se estableció en una concentración de 10^{-6} M para el biosensor y de 10^{-7} M para el método espectrofotométrico) no se detectó la presencia de peróxido de hidrógeno. También se comprobó que la inhibición con fluoruros eliminaba toda la CCD, como discutiremos más adelante. En base a estos resultados se consideró que la señal catalítica directa correspondía sólo a enzima orientada con el centro T1 en transferencia directa con el electrodo.

4.2.5.4. Sensibilidad

En la figura 4.34 puede observarse la alta sensibilidad de la respuesta del electrodo frente a la presencia de oxígeno. Cuando se realizaron medidas en voltamperometría cíclica con el electrodo dentro de la cámara anaerobia, se observó electrocátalisis de reducción de oxígeno, a un potencial de +600 mV, a concentraciones de oxígeno en disolución tan bajas como 11 μM (figura 4.34.a). En el caso de realizar la medida en CA, la concentración de oxígeno detectada fue 76 μM para CCD, mientras que en presencia de mediador se detectaron concentraciones de oxígeno de 7,6 μM (figura 4.34.b). Esta diferencia de sensibilidad entre las medidas en VC y CA puede explicarse debido a que las medidas de VC se realizaron en atmósfera de nitrógeno dentro de la cámara anaerobia ($C_{\text{O}_2} < 0,1$ ppm), mientras que las medidas de CA se realizaron en disoluciones desoxigenadas con argón fuera de la cámara anaerobia, manteniendo el gas sobre la disolución durante la medida, por lo que es posible que la concentración residual de oxígeno en este caso fuera mayor.

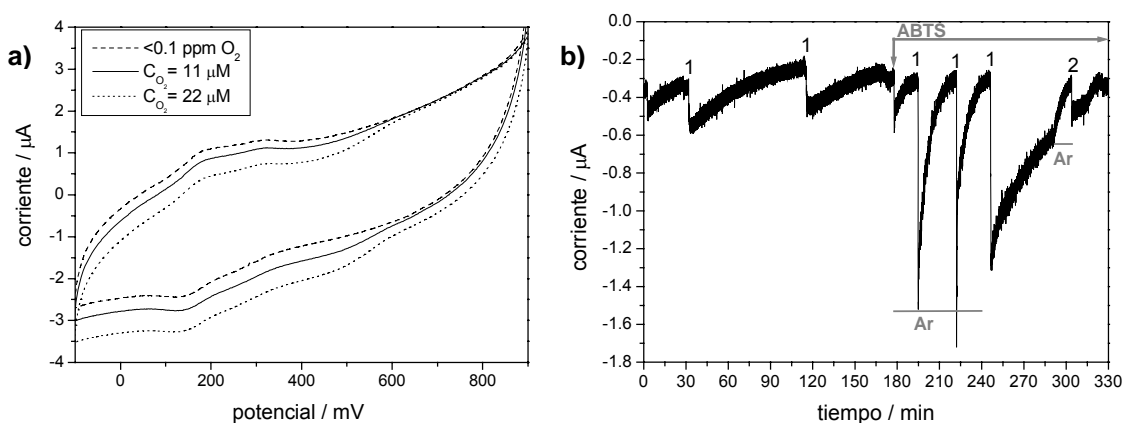


Figura 4.34. Respuesta de un electrodo LDG funcionalizado con una monocapa de aminofenoles sobre el que se ha inmovilizado covalentemente la enzima de *T. hirsuta* mediante

formación de enlace amida. a) VCs. Las distintas concentraciones de oxígeno se obtuvieron mediante la inyección de volúmenes conocidos de una disolución saturada en oxígeno en la celda de medida. b) CA. En los tiempos señalados como 1 se inyectó tampón saturado en oxígeno, obteniendo una concentración de oxígeno en celda de 76 μM . A los 178 minutos se añadió a la celda ABTS en una concentración 0,2 mM. A tiempo 2 se inyectó tampón para una concentración de oxígeno 7,6 μM . En los momentos señalados en el gráfico como Ar se borboteó este gas en la disolución.

4.2.5.5. Estabilidad

La estabilidad de la señal catalítica es de gran importancia para el uso del electrodo como biocátodo en pilas de combustible. Sin embargo, la mayoría de los biocátodos diseñados no reportan datos acerca de la estabilidad de los mismos en las condiciones de trabajo^{13, 45, 50}.

En la figura 4.35 puede verse la estabilidad de la CCD obtenida cuando la lacasa de *T. hirsuta* se inmovilizó covalentemente a través de enlace amida sobre un electrodo LDG funcionalizado con una monocapa de aminofenilos. Cuando la enzima se encuentra unida covalentemente al electrodo se retiene cerca del 75% de la corriente inicial después de diez días de funcionamiento en continuo. Además, la corriente obtenida se recupera de los efectos provocados por ciclos de saturación con argón/oxígeno, o por la adición/eliminación de ABTS del tampón de medida. Tampoco afecta a la señal la renovación de la disolución de medida por tampón nuevo.

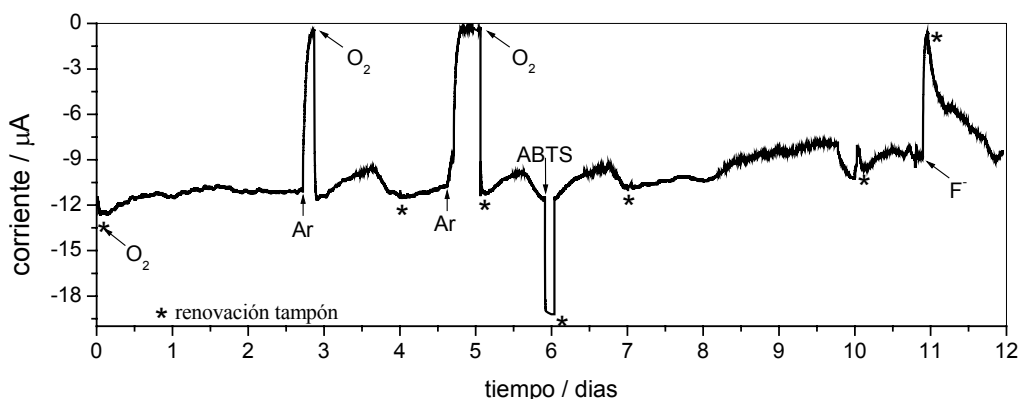


Figura 4.35. Estabilidad de un electrodo LDG funcionalizado con una monocapa de aminofenilos sobre la que se ha unido covalentemente la enzima de *T. hirsuta*. La corriente se ha medido en continuo durante doce días, a +200 mV bajo agitación magnética, realizando ciclos de saturación argón/oxígeno, renovaciones del tampón de medida (*) y adición de ABTS y fluoruros, tal como se indica en la gráfica.

La estabilidad de este electrodo trabajando en continuo es comparable a las reportadas en la bibliografía con medidas realizadas en discontinuo, guardando el electrodo a 4°C en los intervalos de reposo. En el caso de un electrodo PG funcionalizado con antraceno se retuvo un 60% de la CCD inicial tras ocho semanas de almacenamiento y medidas discontinuas, como reportan Blandford y cols.¹⁸. Liu y cols.⁶¹ reportan que cuando la lacasa se adsorbió en un gel de nanotubos de carbono hidrofóbico, se retuvo el 90% de CCM tras 18 días de almacenamiento y medidas discontinuas. Cabe destacar el trabajo de Tsujimura y cols.⁹⁹, que reportaron una CCD prácticamente constante durante 10 días de medida en continuo; sin embargo, la medida fue realizada bajo un flujo lento de disolución saturada de aire, unas condiciones menos exigentes que las utilizadas en esta tesis, en las cuales se borbotea O₂ fuertemente para evitar que el transporte de sustrato hacia el electrodo enzimático limite las densidades de corriente medidas.

Como ya se comentó en el apartado 4.2.3.1, durante el presente trabajo se utilizaron dos lotes diferentes de enzima que presentaron diferente estabilidad. A pesar de la menor estabilidad del segundo lote de enzima, la corriente de reducción de oxígeno obtenida cuando la inmovilización se realizó de forma covalente a la monocapa fue más estable que cuando la enzima se inmovilizó en un electrodo desnudo o en un electrodo funcionalizado con monocapa sin enlace covalente (figura 4.36), lo que pone de manifiesto la importancia del enlace covalente en la estabilidad de la señal.

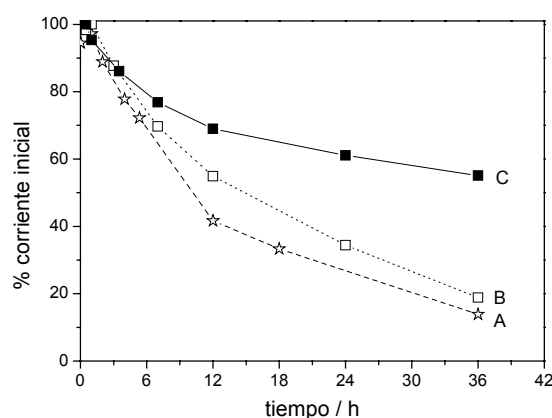


Figura 4.36. Estabilidad de la corriente obtenida para un electrodo LDG sobre el que se ha inmovilizado la enzima de *T. hirsuta* (a) por adsorción física sobre el electrodo desnudo, intensidad de corriente inicial 3,5 μ A; (b) absorción física sobre el electrodo funcionalizado con una monocapa de aminofenilos, intensidad de corriente inicial 12,0 μ A; (c) inmovilización covalente por formación de enlace amida sobre el electrodo funcionalizado con una monocapa de aminofenilos, corriente inicial 21,6 μ A.

La diferencia de estabilidad entre los dos lotes de lacasa se atribuyó a problemas producidos durante la purificación del segundo lote de enzima. Sin embargo, para asegurarnos de que la falta de estabilidad se debía a la enzima y no a una menor estabilidad del enlace lacasa-monocapa, se realizaron controles en los que, posteriormente al enlace covalente, se realizó un entrecruzamiento con glutaraldehído, con el fin de impedir la difusión al medio de las enzimas que pudieran no estar unidas covalentemente⁶². En estas condiciones las intensidades de corriente obtenidas fueron menores que en ausencia de glutaraldehído, mientras que la estabilidad del electrodo apenas mejoró (figura 4.37). De esta forma quedó demostrado que la pérdida de intensidad de corriente era debida fundamentalmente a la desnaturalización estructural de la lacasa y no a su despegue de la superficie del electrodo.

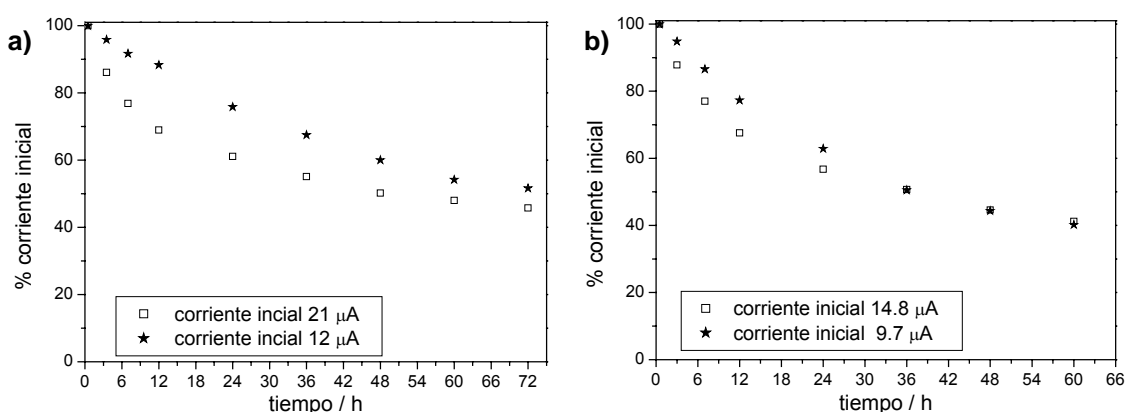


Figura 4.37. Estabilidad de los electrodos funcionalizados con monocapa de aminofenilos (a) y de aminofenoles (b), sobre los que se ha inmovilizada la lacasa del lote 2 a través de la reacción de formación de grupos amida (□), procediendo en uno de los casos al posterior entrecruzamiento con glutaraldehído (■). Las corrientes iniciales se detallan en la grafica.

4.2.5.6. Inhibición por haluros

4.2.5.6.1. Fluoruros

En la figura 4.38 se observa el efecto que la adición de fluoruros al medio produce sobre las corrientes directa y mediada. Ambas corrientes se inhiben completamente incluso en la presencia de bajas concentraciones de fluoruros. Así mismo, se observa que se trata de una inhibición reversible, recuperando el 80 % de la CCD inicial a las cinco horas de cambiar el tampón por uno fresco sin fluoruros (figura 4.38.a). Incluso se llegó a recuperar totalmente la corriente inicial tras veinte horas de medida en continuo, como ya se ha demostrado anteriormente (figura 4.35).

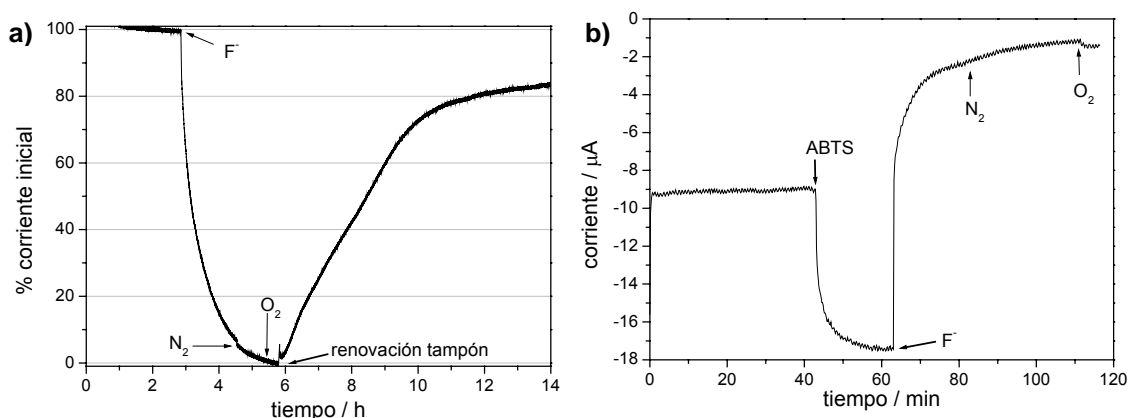


Figura 4.38. Efecto de la adición de fluoruros (concentración 13 mM) en la corriente obtenida en CA para un electrodo LDG funcionalizado con monocapa de aminofenilos sobre el que se ha inmovilizado covalentemente enzima. **a)** CCD, corriente inicial $-8.9 \mu\text{A}$. **b)** CCM.

Estos resultados están en concordancia con la hipótesis defendida por varios autores de que los fluoruros inhiben la enzima lacasa bloqueando la transferencia electrónica entre los centros T1 y T2/T3^{73, 94, 102}. De acuerdo con ese mecanismo, tanto la CCD como la CCM se inhiben en presencia de fluoruros. Como ya se ha discutido con anterioridad, la inhibición total de la catálisis (nótese que en la figura 4.38 no se observa cambio de corriente al desplazar con nitrógeno el oxígeno de la celda electroquímica en presencia de fluoruros) indica que la CCD es consecuencia de la transferencia de electrones entre el centro T1 de la lacasa y el electrodo, no contribuyendo a la catálisis directa moléculas que pudieran estar orientadas con el centro T2/T3 hacia el electrodo⁸⁰.

4.2.5.6.2. Cloruros

En la figura 4.39.a puede observarse como la adición de cloruros, incluso a concentraciones del orden de 0,4 M, no afecta a la CCD cuando la enzima se encuentra inmovilizada de forma covalente sobre el electrodo funcionalizado con una monocapa de aminofenilos. La CCM, en cambio, si se ve afectada por la presencia de cloruros en el medio (figura 4.39.b). La corriente catalítica obtenida en presencia de mediador disminuye hasta el valor obtenido en ausencia de mediador, lo que indica que en presencia de cloruros sólo es posible medir CCD. Dicho efecto se comprobó para diferentes mediadores (ferricianuro, catecol y ABTS), observándose para todos el mismo efecto (figura 4.39.b).

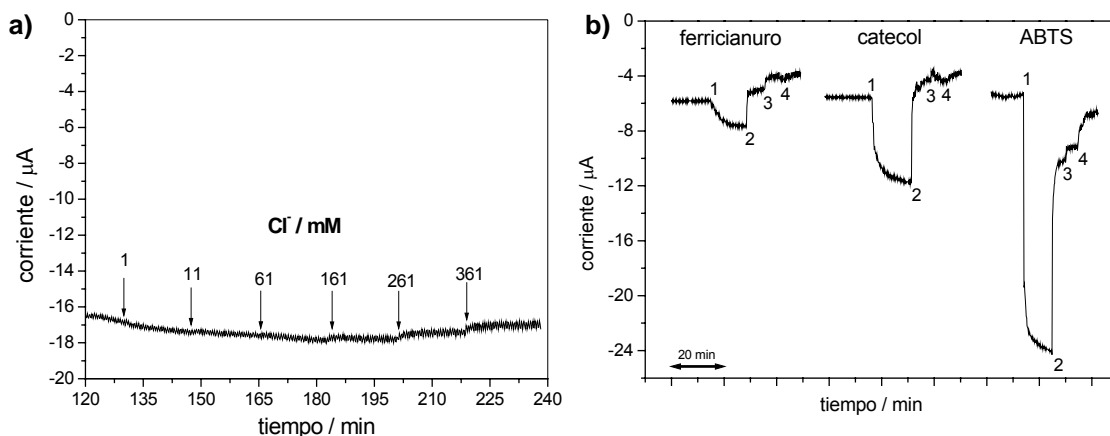


Figura 4.39. Efecto de la adición de cloruros sobre la intensidad de corriente obtenida por CA para un electrodo LDG funcionalizado con monocapa de aminofenilos sobre el que se ha inmovilizado covalentemente lacasa de *T. hirsuta*. **a)** CCD. Lacasa del lote 1 **b)** CCM. A tiempo 1 se añadió el mediador (ferricianuro, catecol o ABTS) hasta una concentración 0,4 mM. En los tiempos 2, 3 y 4 las concentraciones de cloruros en el medio fueron 150, 300 y 450 mM respectivamente. Lacasa del lote 2.

Esta diferencia en el efecto de la inhibición por parte de los cloruros y los fluoruros en la electrocatálisis de lacasa inmovilizada sobre electrodos no ha sido reportada con anterioridad, aunque sí se habían notado diferencias en la cinética de inhibición de cloruros y fluoruros⁷². En base a los datos obtenidos, se puede postular que los fluoruros penetran en la estructura de la lacasa bloqueando el camino electrónico intramolecular entre los centros de cobre, impidiendo la catálisis enzimática, y por tanto la CCD y la CCM (figura 4.40.a). En cambio, los cloruros no podrían penetrar tanto en la lacasa, por impedimentos estéricos debidos a su mayor tamaño. Sin embargo los Cl⁻ pueden bloquear la región de la lacasa a la que el mediador redox se asocia, impidiendo la transferencia electrónica del mediador al enzima, por lo que no es posible medir CCM (figura 4.40.b), aunque en este caso la presencia de cloruros no impediría la transferencia electrónica directa desde el electrodo hasta el centro T1 de la lacasa. El hecho reportado de que la inhibición por Cl⁻ de una lacasa fúngica es competitiva respecto al sustrato donador de electrones, mientras que la de F⁻ no lo es, va a favor de esta hipótesis⁷². Además, también se ha sugerido en la literatura que el inhibidor I⁻ se une a una zona próxima del centro T1¹⁰¹. Tomando en conjunto todos estos resultados se puede postular que los sitios de unión de los aniones F⁻ y Cl⁻ son diferentes (figura 4.40). Sin embargo, sería preciso un estudio más exhaustivo para poder confirmar los diferentes sitios de unión de haluros a lacasas.

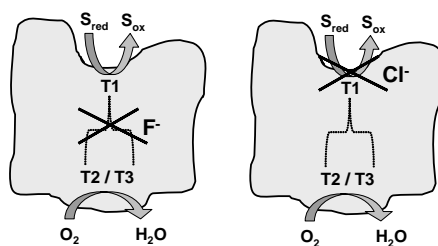


Figura 4.40. Representación de los posibles mecanismos de inhibición de los haluros en el proceso catalítico de la lacasa.

Como ya se ha comentado durante el presente trabajo, se usaron dos lotes de lacasa que presentaron diferencias en su estabilidad debido a problemas ocurridos durante el proceso de purificación del segundo lote de enzima. Esas diferencias entre los lotes también se observaron frente a la inhibición por cloruros, presentando el segundo lote una menor resistencia a la inhibición. Aún así, el electrodo mantuvo el 50 % de su actividad aún cuando se midió a altas concentraciones de cloruros (0,8 M) como se aprecia en la figura 4.41. Los mismos resultados se obtuvieron tanto cuando la medida se realizó con la enzima inmovilizada covalentemente en una monocapa de aminofenilos o de aminofenoles. Cabe destacar que la disminución de la señal no se debe a la inactivación o pérdida de enzima en esas condiciones, puesto que, cuando el electrodo se pasó a una disolución libre de cloruros, recuperó prácticamente toda la señal inicial. Por lo tanto es posible que en este lote la estructura de la lacasa sea ligeramente diferente, permitiendo que los cloruros penetren más en la estructura de la lacasa, bloqueando así parcialmente la CCD.

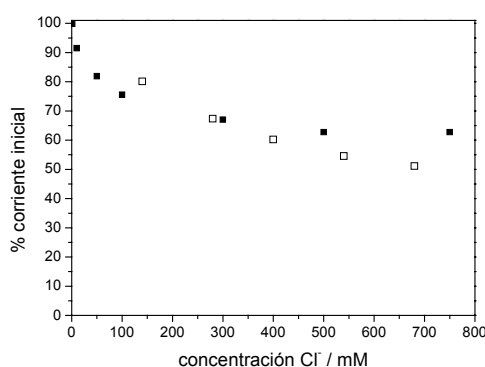


Figura 4.41. Efecto de la inhibición de cloruros sobre la intensidad de corriente obtenida para un electrodo LDG modificado con lacasa unida covalentemente mediante enlace amida a la monocapa de aminofenilos (□) o aminofenoles (■).

4.2.5.7. Efecto de la velocidad de rotación del electrodo

Como puede observarse en la figura 4.42, la velocidad de rotación del electrodo apenas afecta a la intensidad de corriente obtenida, lo que indica que el proceso no se encuentra limitado por el aporte de oxígeno al electrodo, lo que no es de extrañar debido al alto coeficiente de difusión del O_2 , $19,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Cuando las medidas se realizan en disolución saturada de aire (figura 4.42.a), la concentración de oxígeno ($\sim 0,26 \text{ mM}$) es menor a la $K_M^{O_2}$ de la lacasa ($0,32 \text{ mM}$, medida en el apartado 4.1.3) por lo que la concentración de sustrato puede limitar la corriente catalítica. Así se observa en la figura 4.42.b, en la cual la intensidad de corriente catalítica aumenta cuando las medidas se realizan en disolución saturada de oxígeno, en el que la concentración de O_2 es suficientemente alta para no ser limitante ($\sim 1,22 \text{ mM}$). Por lo tanto, la etapa limitante en saturación de O_2 puede ser la transferencia electrónica entre la lacasa y el electrodo, la transferencia electrónica intramolecular en la lacasa, o la etapa de reducción de O_2 a H_2O en el centro T2/T3.

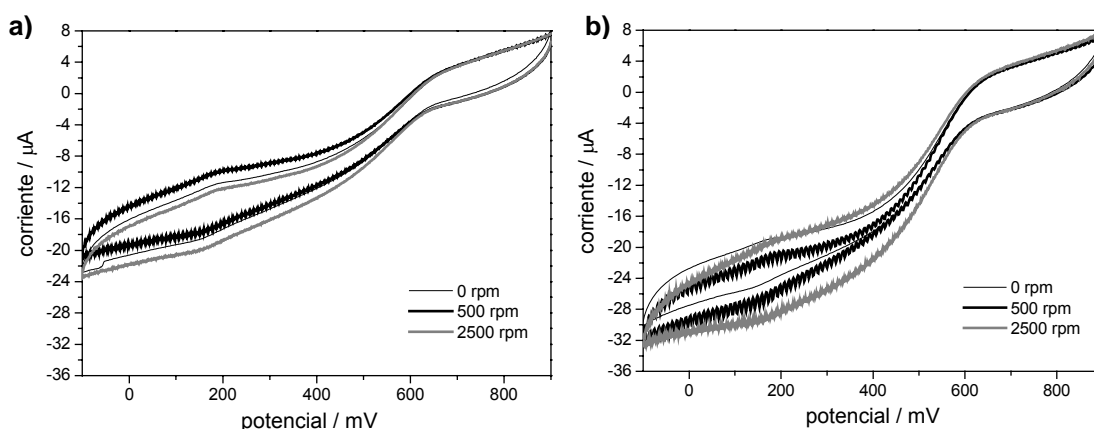


Figura 4.42. Efecto de la rotación sobre un electrodo LDG funcionalizado con monocapa de aminofenoles sobre el que se ha inmovilizado covalentemente lacasa mediante formación de enlace amida. Las medidas se han realizado a 10 mV/s , (a) bajo condiciones de saturación de aire, y (b) bajo condiciones de saturación de oxígeno.

En las medidas realizadas en una disolución saturada en oxígeno (figura 4.38.b) se cumplen las condiciones en que no hay limitación por la transferencia de O_2 al electrodo. Corrigiendo la línea base (VC medido en condiciones anaerobias) al voltamperograma realizado a 2500 rpm se obtiene un VC que alcanza un plató cuya intensidad de corriente es $-21,6 \text{ μA}$ (figura 4.43, línea continua). Puesto que no hay

control cinético de transferencia de masa, dicha corriente de plató (i_{lim}) se puede definir como⁷⁷:

$$i_{lim} = \frac{nFA\Gamma k_{cat} C}{C + k_M} \quad (\text{ecuación 4.3})$$

donde, n es el número de electrones intercambiados, $n = 4$ para la reducción de oxígeno a agua; F es la constante de Faraday, 96480 C mol^{-1} ; A es el área electroquímica de la superficie, $0,48 \text{ cm}^2$ para un electrodo LDG; Γ es el recubrimiento de enzima catalíticamente activa en la superficie (mol cm^{-2}); k_{cat} es la constante catalítica enzimática aparente (s^{-1}); C es la concentración de oxígeno, $1,22 \text{ mM}$ para una disolución saturada en O_2 ; y k_M es la constante de Michaelis-Menten respecto al oxígeno, para la *T. hirsuta* $k_M = 0,30 \text{ mM}$ (ver apartado 4.1.3).

La k_{cat} aparente no la conocemos para la lacasa inmovilizada en el electrodo, pero sí conocemos la k_{cat} del oxígeno usando ABTS como donador de electrones, siendo $k_{cat} = 348 \text{ s}^{-1}$ para el lote de lacasa usado en el experimento (ver apartado 4.1.3). Podemos asumir que k_{cat} en el electrodo será mayor o igual a 348 s^{-1} , puesto que engloba las mismas etapas del proceso enzimático salvo la de intercambio electrónico entre el ABTS y el centro T1. De este modo podemos estimar el recubrimiento de lacasa capaz de realizar transferencia directa con el electrodo a partir de la ecuación 4.3, obteniendo un valor de $\Gamma_{lacasa} \leq 0,42 \cdot 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$. Es decir, el recubrimiento es menor a una monocapa compacta de enzima absorbida que es detectable por VC no catalítica ($3\text{-}9 \text{ pmol cm}^{-2}$)⁷⁷. El recubrimiento estimado para la lacasa se aproxima a los conseguidos con monocapas de hidrogenasa³⁰ y glucosa oxidasa⁷ unidas por interacciones avidina/biotina, en ambos casos $\Gamma \approx 0,8 \cdot 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$.

Cuando el VC no está limitado por la transferencia de O_2 también se puede analizar el mecanismo catalítico de la lacasa inmovilizada en el electrodo en base a las ecuaciones de Leger y cols. desarrolladas para electrodos de hidrogenasas⁵⁷.

El caso más sencillo es el de una monocapa de lacasa perfectamente orientada, en el que es constante la distancia del electrodo al centro T1 de cada molécula y, por tanto, también la constante de transferencia electrónica heterogénea (k_o). Además, se considera que la k_o está limitada cinéticamente por la transferencia del primer electrón. En este caso, la intensidad de corriente para un proceso catalítico de reducción, en el que no hay limitación por la transferencia de masa, en función del potencial es^{33, 57}:

$$i = \frac{i_{\text{lim}}}{1 + e^{f(E^0 - E'_{T1})} + \frac{k_{\text{cat}}}{k_0} e^{\frac{f}{2}(E^0 - E'_{T1})}} \quad (\text{ecuación 4.4})$$

donde, $f = F/RT$; k_{cat} es la constante catalítica enzimática aparente, que engloba la transferencia electrónica intramolecular y la reducción de oxígeno a agua en el centro T2/T3; E'_{T1} es el potencial formal del centro T1, (+780 mV vs. ENH para la lacasa de *T. hirsuta*⁹¹); e i_{lim} es la corriente de plató cuando no hay control cinético de transferencia de masas.

Partiendo del VC experimental corregido en que no hay limitación por la transferencia de O₂ (figura 4.43, línea continua), se realizaron una serie de ajustes con el fin de estudiar el mecanismo catalítico de la lacasa inmovilizada en electrodos de carbono.

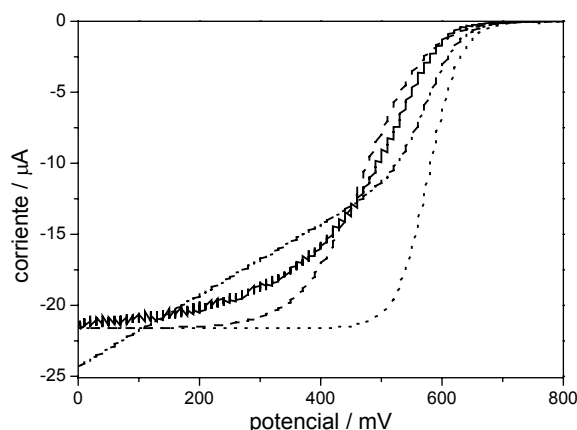


Figura 4.43. Ajuste de las ecuaciones de Leger al VC experimental (—). Ajuste 1 (.....); ajuste 2 (---); ajuste 3 (---).

Ajuste 1: caso límite en que $k_0 \gg k_{\text{cat}}$, esto es, no hay limitación en la transferencia electrónica heterogénea. En este caso la ecuación 4.4 se puede escribir como:

$$i = \frac{i_{\text{lim}}}{1 + e^{f(E^0 - E'_{T1})}} \quad (\text{ecuación 4.5})$$

siendo el VC una sigmoide perfecta. En este caso la corriente catalítica responde a la concentración de Cu T1 reducidos según la ecuación de Nernst. Como puede apreciarse en la figura 4.43 (línea punteada), el ajuste no se corresponde con la curva experimental porque el plató experimental se alcanza a potenciales 400 mV más negativos. Por lo tanto, k_0 claramente limita el proceso catalítico.

Ajuste 2: limitación por k_0 en una monocapa orientada (k_0 igual para todas las moléculas). El ajuste a la ecuación 4.3 en este caso, considerando que el potencial del centro T1 de la enzima no varía ($E'_{T1}=780$ mV vs. ENH), se ajusta mejor a la curva experimental, aunque aún existe una diferencia de unos 200 mV en el potencial al que se alcanza el plató (figura 4.43, línea discontinua). Dicho ajuste presenta un coeficiente de regresión $r = 0,96$ y un valor de $k_{cat}/k_0 = 7,7 \pm 0,1$.

Ajuste 3: se considera el caso de orientación al azar. De esta forma, las distancias de los centros T1 al electrodo son variables, por lo que hay una distribución homogénea de k_0 que corresponde a distancias que van de d_{min} a $d_{min} + d_0$. La k_{0max} corresponde en este caso a d_{min} . La ecuación de Leger considera que todas las distancias son igualmente probables por lo que la ecuación 4.4 toma la forma^{33, 57}:

$$i = \frac{i_{lim}/\beta d_0}{1 + e^{f(E^0 - E'_{T1})}} \ln \left(\frac{1 + e^{f(E^0 - E'_{T1})} + \frac{k_{cat}}{k_{0max}} e^{\frac{f}{2}(E^0 - E'_{T1})}}{\frac{k_{cat}}{k_{0max}} e^{\frac{f}{2}(E^0 - E'_{T1})}} \right) \quad (\text{ecuación 4.6})$$

donde, β es la constante de decrecimiento de transferencia electrónica con la distancia, $\sim 1 \text{ \AA}^{-1}$; y d_0 es el intervalo de distancias entre la distancia mínima y la distancia máxima que da lugar a transferencia electrónica directa medible⁵⁷.

El ajuste 3 de los parámetros experimentales de la ecuación 4.6 representado en la figura 4.43 (línea de rayas y puntos), ofrece unos valores de $r = 0,95$, $k_{cat}/k_0 = 5 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-4}$ y $\beta d_0 = 16,7 \pm 0,3 \text{ \AA}$. En este caso el ajuste es peor porque se obtiene un incremento lineal de la corriente catalítica a sobrepotenciales altos, y no un plató como en la curva experimental. Además, teniendo en cuenta que la distancia mínima entre el cobre T1 y el electrodo ha de ser de unos 10 \AA aproximadamente (considerando el espesor de la monocapa y la distancia del centro T1 a la superficie de la lacasa), no es realista que la k_0 sea 2000 veces mayor que la k_{cat} . Además, a una temperatura de unos 30 °C Leger obtiene que $k_{0max} \approx 10 k_{cat}$ para hidrogenasa, y en este caso la hidrogenasa estaba absorbida directamente sobre el electrodo ($d_{min} \approx 5 \text{ \AA}$).

En conclusión, el experimento se ajusta mejor al caso de una monocapa idealmente orientada (ajuste 2) con un valor de k_0 aproximadamente ocho veces inferior a k_{cat} . En este caso, si $k_{cat} \geq 348 \text{ s}^{-1}$, entonces $k_0 \geq 70 \text{ s}^{-1}$. La k_0 calculada por Johnson y cols.⁴⁸ para lacasa *Rhus vercecifera* unida covalentemente a una SAM en oro es $8,31 \text{ s}^{-1}$, es decir, inferior al mínimo estimado en esta tesis.

4.2.6. Inmovilización de lacasa de *Trametes hirsuta* a través de sus residuos de azúcares superficiales (formación de bases de Schiff)

Mediante tratamiento del enzima con peryodato se consigue la oxidación de sus grupos azúcares superficiales a grupos aldehído que, a pH neutro, pueden reaccionar con grupos amino del electrodo formando un enlace imina o base de Schiff⁴⁴. De esta forma, la enzima queda unida de forma covalente al electrodo.

A pesar de que el porcentaje de carbohidratos en la *T. hirsuta* es muy bajo ($12 \pm 1 \%$)⁹¹, la mayoría se encuentran presentes en una zona cercana al centro T1 (figura 1.9.c), lo que puede favorecer la obtención de transferencia directa electrónica entre dicho centro y el electrodo. Así, cuando la *T. hirsuta* se inmoviliza covalentemente mediante formación de base de Schiff a una superficie de oro funcionalizada con una SAM de 4-aminotiofenol, se observa CCD a partir de un potencial +510 mV vs. ENH, uno de los potenciales más positivos descritos en oro⁸⁹. Además, dicha corriente es inhibida por la adición de fluoruros, lo que hace pensar que la lacasa se encuentra orientada a través del centro T1⁸⁹.

En este capítulo se discuten los resultados obtenidos cuando la lacasa se inmoviliza en los electrodos de grafito funcionalizados con monocapas de grupos amino a través de este método de inmovilización.

4.2.6.1. Efecto en la actividad enzimática en disolución

Previo a la inmovilización, se estudió el efecto que el tratamiento con peryodato, y por tanto la oxidación de los azúcares de la lacasa, pudiera tener sobre la actividad de la misma. Para ello se realizaron ensayos espectrofotométricos de actividad, usando ABTS como sustrato (ver apartado 3.2.1.2 de Materiales y Métodos), de una muestra de lacasa tratada con peryodato. Hay que destacar que la señal obtenida fue corregida mediante un blanco de peryodato, puesto que la separación entre el peryodato y la lacasa requeriría un tratamiento de ultrafiltración que podría afectar a la actividad y/o concentración de la muestra.

La actividad de la muestra tratada con peryodato (232 ± 71 U/mg) fue muy similar a la obtenida para la lacasa sin tratar (251 ± 45 U/mg), por lo que se puede concluir que la oxidación de los azúcares superficiales de la lacasa no afecta a su capacidad catalítica.

4.2.6.2. Respuesta electrocatalítica

Las respuestas obtenidas cuando la inmovilización se lleva a cabo en las distintas superficies electródicas a través de la formación de una base de Schiff entre los azúcares oxidados de la enzima y los grupos amino de la monocapa (tanto de aminofenilos como de aminofenoles) pueden verse en la tabla 4.22. Al igual que cuando la inmovilización se lleva a cabo mediante formación de enlace amida, en las superficies de carbono vitrificado (GC) y grafito pirolítico (PG) las corrientes obtenidas son notablemente menores a aquellas obtenidas en los electrodos LDG. En estos electrodos, sin embargo, la CCD obtenida es prácticamente el doble que al realizar la inmovilización con NHS y EDC (tabla 4.17), a pesar de que la CCM es del mismo orden en ambos casos. Esta diferencia puede deberse a que los grupos azúcares presentan una menor distribución en la lacasa que los grupos carboxílicos (figura 1.5), por lo que las posibilidades de unión no orientada es mayor en el segundo caso.

Monocapa	aminofenilos			Aminofenoles		
Electrodo	CCD $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	CCM $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	CCD/CCM	CCD $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	CCM $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	CCD/CCM
GC	0	-2,6	/	-0,1	-0,9	0,11
PG	-10,7	-21,4	0,5	-2,5	-19,1	0,13
LDG	-457,1	-500,0	0,91	-648,6	-657,1	0,99

Tabla 4.22. Corrientes electrocatalíticas de reducción de oxígeno obtenidas en distintas superficies de carbón funcionalizadas con monocapas de aminofenilos o aminofenoles sobre las que se procedió a la inmovilización covalente de lacasa de *T. hirsuta* mediante formación de base de Schiff. Para su comparación se presentan las densidades de corriente, obtenidas usando el área geométrica de los electrodos.

4.2.6.3. Orientación de la lacasa

Cuando la inmovilización se llevó a cabo a través de formación de base de Schiff en electrodos LDG, la relación CCD/CCM fue prácticamente uno, como se aprecia en los cronoamperogramas de la figura 4.44. Este dato indica que por éste método se aumenta sustancialmente el porcentaje de moléculas de lacasa inmovilizadas con orientación favorable para la transferencia directa entre la enzima y el electrodo respecto a la inmovilización mediante enlace amida..

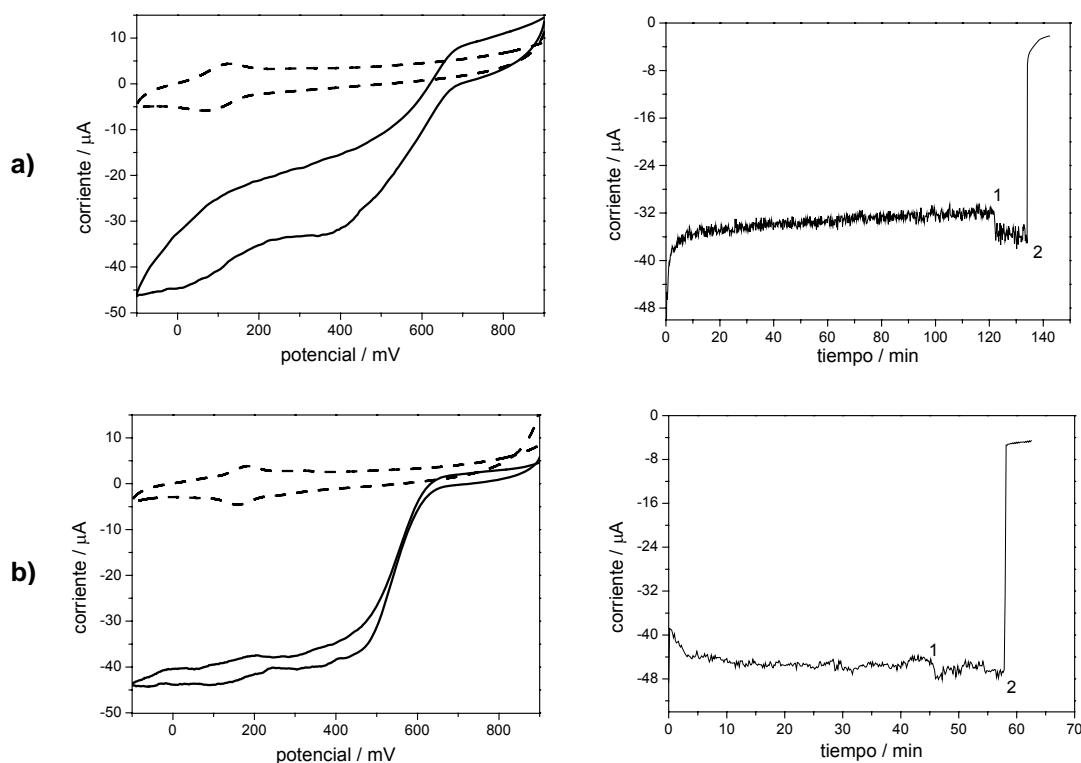


Figura 4.44. VC (izquierda) y CA (derecha) obtenidos cuando se lleva a cabo la inmovilización covalente de lacasa de *T. hirsuta*, por formación de base de Schiff, sobre electrodos LDG funcionalizados con una monocapa de aminofenilos (a) o de aminofenoles (b). En los VCs se representan las CCD obtenidas bajo atmósfera de nitrógeno (--) o de oxígeno (—). En las CAs la medida se inició bajo borboteo de oxígeno, en el tiempo 1 se añadió a la disolución de medida ABTS hasta una concentración 0,2 mM, y en el tiempo 2 se añadieron fluoruros al medio.

En el VC obtenido cuando la inmovilización se lleva a cabo sobre la monocapa de aminofenilos (figura 4.44.a), se observan dos cambios de pendiente en la reducción, a 700 mV y a 200 mV. Dichos potenciales se corresponden con los potenciales de los centros T1 (780 mV vs. ENH)⁹¹ y T2 (aprox. 400 mV vs. ENH)⁸⁹ de la enzima, por lo que existe la posibilidad de que se den en el electrodo las dos orientaciones con posibilidad de CCD. Sin embargo no se obtuvieron indicios de la presencia de H₂O₂ en el medio cuando se llevó a cabo la CA, y los fluoruros inhibieron completamente la CCD, no encontrándose ninguna diferencia entre la corriente residual obtenida en presencia de fluoruros y en condiciones anaerobias. Se consideró, por tanto, que la CCD solo tuviera lugar a través del centro T1. El que se vean dos procesos catalíticos a diferentes potenciales redox podría explicarse por dos orientaciones de lacasa

inmovilizada, una con distancia más optima para transferencia electrónica directa a través del T1 y que tiene lugar a su potencial redox formal y otra a una distancia superior que produce que el proceso catalítico se desplace 400 mV a valores más negativos (ver el modelo de Leger explicado en el apartado 4.2.6.4)

Al igual que se había observado al llevar a cabo la inmovilización de la enzima formando enlaces amidas, no se detectaron los centros redox de la enzima cuando la voltamperometría se realizó en condiciones estrictamente anaerobias (dentro de la cámara anaerobia). Esto probablemente se debe a la pequeña cantidad de lacasa inmovilizada sobre el electrodo, solo una monocapa, por lo que es muy difícil distinguir en la corriente de fondo unas corrientes muy bajas debidas a la oxidación/reducción de los centros Cu de la lacasa en ausencia de catálisis.

4.2.6.4. Efecto de la rotación

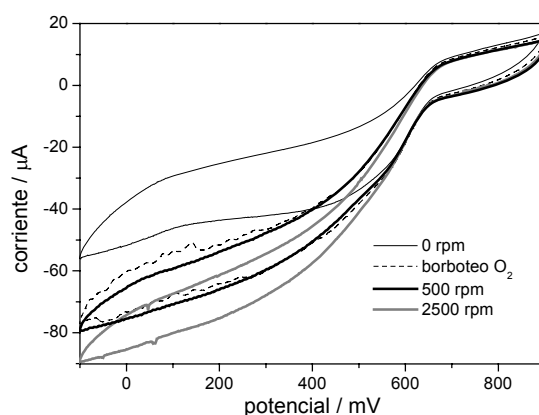


Figura 4.45. Efecto del transporte de O₂ a un electrodo LDG funcionalizado con una monocapa de aminofenilos y sobre el que se ha inmovilizado covalentemente lacasa de *T. hirsuta* por formación de una base de Schiff.

Al igual que se había hecho cuando la inmovilización se realizó mediante enlace amida, se estudió el efecto que pudiera tener la rotación sobre la respuesta del electrodo. En la figura 4.45 se observa un aumento del 30% en la corriente catalítica cuando la medida se lleva a cabo bajo rotación (500 rpm) respecto al VC en condiciones estacionarias. Sin embargo, a mayores velocidades de rotación las corrientes catalíticas apenas varían, como ya se había observado cuando la unión se llevó a cabo formando enlaces amidas (apartado 4.2.5.7). Estos resultados pueden explicarse debido a la efectiva CCD, que conlleva una mayor demanda oxígeno, disminuyendo su concentración local cuando la medida se realiza en condiciones estacionarias, dando

como resultado una corriente limitada por el aporte de oxígeno. Sin embargo, al realizar la medida en condiciones no estacionarias, el aporte de oxígeno deja de ser limitante y se pone de manifiesto la limitación por la transferencia electrónica heterogénea o por la catálisis enzimática. Cabe destacar que con el simple borboteo de oxígeno en la disolución se obtienen los mismos resultados que con la rotación del electrodo a 500 rpm, por lo que las corrientes medidas en CA con borboteo de O₂ en la disolución apenas están limitadas por el aporte de O₂ al electrodo.

Como ya se ha discutido en el apartado 4.2.5.7, cuando no existe limitación en la transferencia de masa, es posible calcular el recubrimiento de lacasas en transferencia directa con el electrodo y realizar un análisis del mecanismo catalítico en base a las ecuaciones de Leger y cols.⁵⁷.

Cuando la medida se llevó a cabo en una disolución saturada en oxígeno con rotación del electrodo a 2500 rpm (figura 4.45), se cumplieron las condiciones en que no existía limitación por la transferencia de O₂. Tras corregir la línea base (medida en condiciones anaerobias) se observa un VC cuyo plató de intensidad de corriente es -65 μ A (figura 4.46, línea continua).

Considerando la ecuación 4.3 y un valor de $k_{cat} \geq 348 \text{ s}^{-1}$ (ver apartado 4.2.5.7), el recubrimiento de lacasas en transferencia directa con el electrodo fue $\Gamma \leq 1,28 \cdot 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$. Como era de esperar por las mayores corrientes obtenidas, el recubrimiento es superior al obtenido cuando la inmovilización se realiza a través de los grupos carboxílicos. Sin embargo, el recubrimiento aún es menor que una monocapa compacta de enzima absorbida detectable por VC no catalítica ($3\text{-}9 \text{ pmol cm}^{-2}$)⁶, lo que explica la imposibilidad de observar los centros redox de la lacasa en condiciones no catalíticas.

En cuanto al análisis del mecanismo catalítico, a continuación se muestra el ajuste a las ecuaciones de Leger para el VC experimental (figura 4.46, línea continua):

Ajuste 1: monocapa de lacasa perfectamente orientada, sin limitación en la transferencia electrónica heterogénea ($k_0 \gg k_{cat}$). El ajuste corresponde a la ecuación 4.5, obteniendo una sigmoide perfecta (figura 4.46, línea punteada).

Ajuste 2: monocapa de lacasa perfectamente orientada con limitación en la transferencia electrónica heterogénea. En este caso el ajuste a la ecuación 4.4, considerando que el potencial del centro T1 de la enzima no varía ($E'_{T1}=580 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$), presenta unos parámetros $r = 0,961$ y un valor de $k_{cat}/k_0 = 5,20 \pm 0,28$. Dicho ajuste no se ajusta totalmente a la curva experimental, existiendo una diferencia de unos 400 mV en el potencial al que se alcanza el plató (figura 4.46, línea discontinua).

Si se considera E'_{T1} como parámetro variable, se obtienen unos valores de $r = 0,964$, $k_{cat}/k_0 = 5,06 \pm 0,03$ y $E'_{T1} = 0,698 \pm 0,4$ mV, por lo que la variación de E'_{T1} apenas afecta al valor de k_{cat}/k_0 .

Ajuste 3: distribución heterogénea de moléculas de lacasa (distribución de k_0 que corresponden a distancias que van de d_{min} a $d_{min} + d_0$). El ajuste a la ecuación 4.6 ofrece unos parámetros, $r = 0,989$, $d_0 = 24,3 \pm 0,3$ Å y $k_{cat}/k_{0max} = (1,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$. En este caso hay que tener en cuenta que la relación k_{cat}/k_{0max} que se calcula corresponde a la distancia mínima a la que puede situarse la lacasa en el electrodo, por lo que su valor no es muy significativo. La curva teórica tampoco se ajusta bien a la curva experimental (figura 4.46, línea de rayas y puntos), ya que la primera no alcanza nunca un plató como en el experimento, sino que da lugar a una pendiente continua⁵⁷. Esto puede ser debido a que el modelo de Leger considera que todas las distancias son igual de probables, mientras que experimentalmente unas distancias pueden ser más probables que otras.

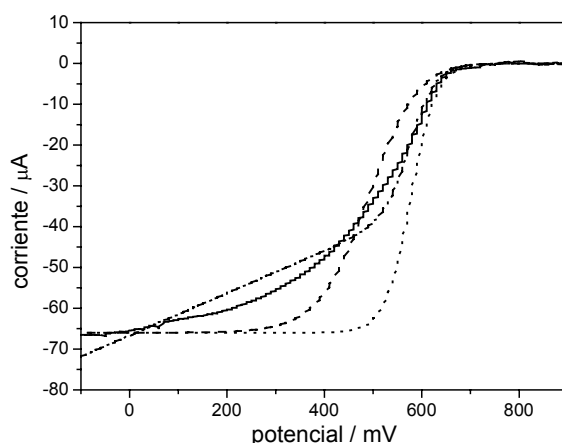


Figura 4.46. Ajuste de las ecuaciones de Leger al VC experimental (—). Ajuste 1 (.....); ajuste 2 (---); ajuste 3 (---).

En conclusión, la curva experimental no se ajusta bien a ninguno de los ajustes presentados, aunque los resultados parecen indicar que hay una distribución de orientaciones de la lacasa con posibilidad de transferencia directa con el electrodo por la que no todos los centros T1 de las moléculas se encuentran a la misma distancia del electrodo. Esto está de acuerdo con el método de inmovilización, en el que hay varias zonas ricas en carbohidratos cercanas al T1 por las cuales se puede anclar el enzima y hace que la corriente límite se alcance a potenciales más alejados del potencial redox del centro T1, no siendo posible en este caso calcular el valor promedio de k_0 .

4.2.6.5. Inhibición por haluros

La inhibición por fluoruros presenta los mismos efectos que se han visto cuando la enzima se une covalentemente a la monocapa formando enlaces amidas, es decir, los fluoruros inhiben completamente tanto la CCD como la CCM de forma reversible, recuperando la señal cuando el electrodo modificado se cambia a un tampón libre de fluoruros.

En cuanto a la inhibición por cloruros, hay que considerar que estos experimentos se llevaron a cabo usando el segundo lote de enzima, que, como ya se ha comentado, presentó menos estabilidad y menos resistencia a la presencia de cloruros en el medio. Los resultados obtenidos (figura 4.47) fueron similares a los obtenidos previamente para este lote de enzima cuando la inmovilización se realizó formando enlaces amida (figura 4.41). Como puede verse en la figura 4.47, la enzima se inhibe ligeramente por la presencia de cloruros, reteniendo más del 50 % de la actividad inicial de CCD incluso a altas concentraciones de cloruros (0,5M).

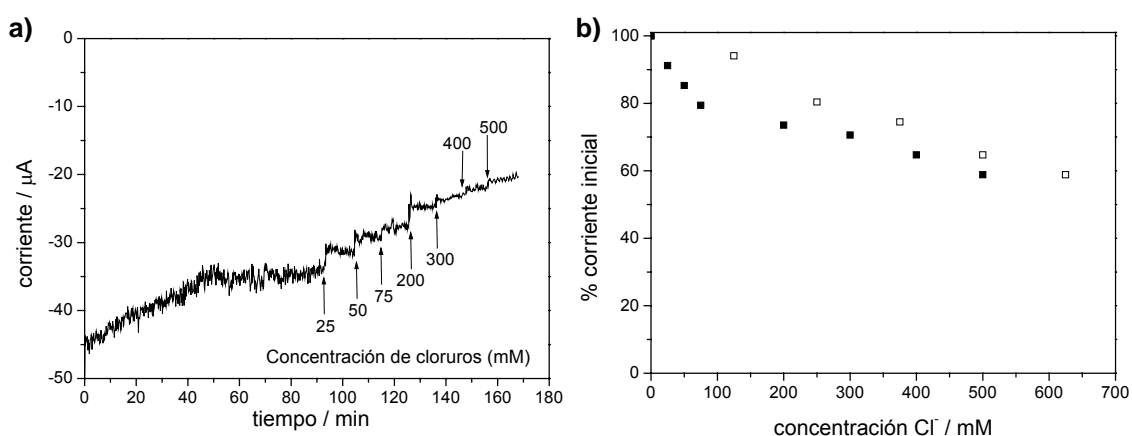


Figura 4.47. a) Efecto de la adición de cloruros sobre la intensidad de corriente obtenida por CA para un electrodo LDG funcionalizado con monocapa de aminofenilos sobre el que se ha inmovilizado covalentemente lacasa mediante formación de una base de Schiff. b) comparación del efecto de los cloruros cuando la inmovilización se lleva a cabo en una monocapa de aminofenilos (■) o de aminofenoles (□).

4.2.6.6. Estabilidad de la señal

La estabilidad de la señal cuando la inmovilización se lleva a cabo a través de enlace covalente mediante formación de bases de Schiff se recoge en la figura 4.48 (1). Se puede apreciar una menor estabilidad de la señal que cuando la inmovilización se

lleva a cabo a través de enlaces amida, siendo similar a la obtenida cuando la enzima se fisisorbe sobre el electrodo (figura 4.36).

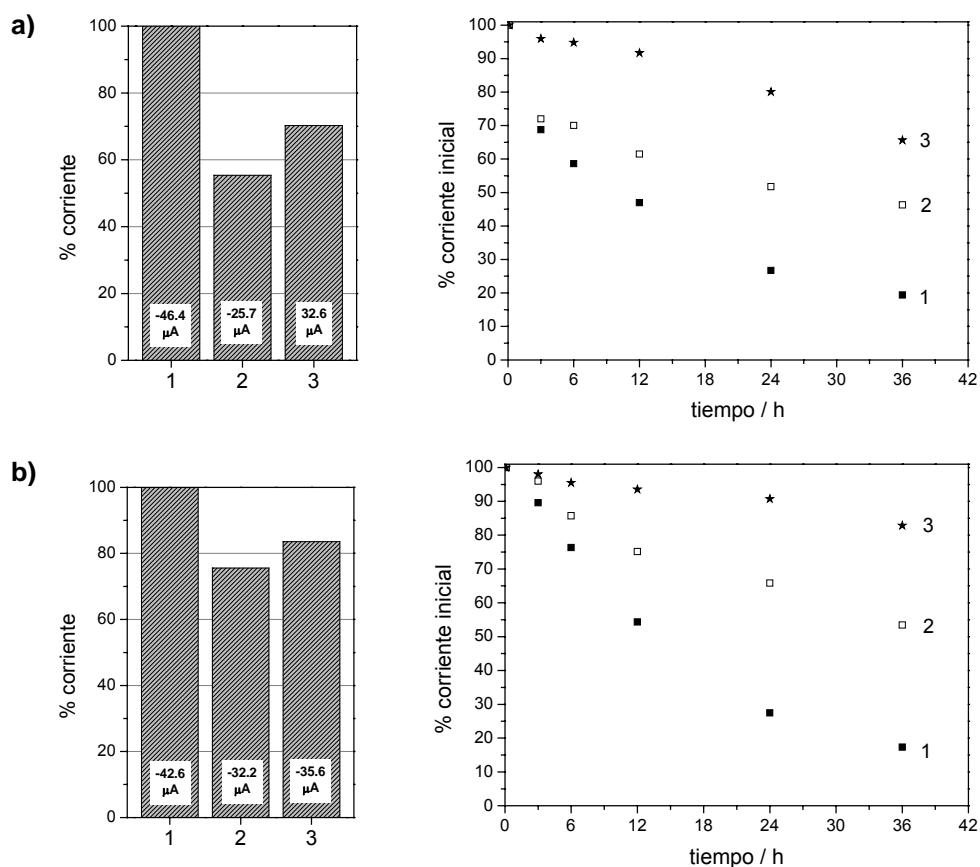
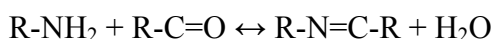


Figura 4.48. Estabilidad de los electrodos funcionalizados con monocapa de aminofenilos (a) y de aminofenoles (b), sobre los que se ha inmovilizada la enzima del lote 2 por formación de base de Schiff (1), procediendo en uno de los casos al posterior entrecruzamiento con glutaraldehído (2) y en otro a la reducción del enlace con dimetilaminoborano (3).

Un tratamiento del electrodo con glutaraldehído al 25 %, posterior a la unión covalentemente de la lacasa mediante formación de base de Schiff, mejora la estabilidad de la señal (figura 4.48-2). Estos resultados indican que la pérdida de corriente cuando la inmovilización se lleva a cabo por formación de base de Schiff se debe a la hidrólisis del enlace enzima-electrodo, con la consecuente pérdida de lacasa. El tratamiento con glutaraldehído mejora la estabilidad, puesto que retiene la lacasa en la superficie electródica debido al entrecruzamiento de las distintas moléculas de enzima, sin embargo, como ya se había visto con anterioridad, el tratamiento con glutaraldehído afecta a la CCD obtenida, disminuyendo su valor entre un 55 y un 75 %. Esta disminución de la CCD puede ser debida a que parte de las enzimas pierden la

capacidad de transferencia directa con el electrodo tras el entrecruzamiento, o a que las lacasas se inactivan por los nuevos enlaces. Este hecho se comprobó midiendo la relación CCD/CCM cuando se llevaron a cabo ambas inmovilizaciones. La CCM fue la misma independientemente del tratamiento con glutaraldehído, sin embargo, la CCD disminuyó cuando se realizó el entrecruzamiento con glutaraldehído. Por lo tanto se puede concluir que el tratamiento con glutaraldehído no inactiva la lacasa, pero disminuye su capacidad de transferencia directa.

Puesto que la formación del enlace covalente mediante formación de base de Schiff se produce de acuerdo con la reacción reversible



en medio acuoso el doble enlace N=C tiende a hidrolizarse. Una forma de estabilizar dicho enlace es reducirlo, obteniendo de este modo un enlace amina estable en medio acuoso. Para ello, se trató el electrodo sobre el que se había inmovilizado la lacasa con dimetil amino borano 25 mM durante 24 horas a 4°C. En este caso la CCD retenida fue superior al 70-80 % de la CCD obtenida antes de este tratamiento y también se observó un aumento de la estabilidad de la señal tras la reducción del enlace (figura 4.48-3).

En resumen, es posible estabilizar la base de Schiff formada entre la lacasa y el electrodo, siendo la reducción del doble enlace N=C el que aporta una mayor estabilidad y menos afecta a la capacidad de transferencia directa del enzima.

4.3. Electrodos de oro

Las superficies de oro modificadas con diferentes grupos funcionales han sido ampliamente estudiadas para la inmovilización de enzima lacasa debido a la facilidad de modificar la superficie mediante la formación de monocapas autoensambladas (SAMs) de tioles⁶³. Sobre dichos electrodos la inmovilización de la lacasa se ha realizado por fuerzas electrostáticas⁴⁶, por entrecruzamiento con glutaraldehído⁴³, por enlace amida entre grupos carboxilo de la superficie y grupos amino de la lacasa^{48, 53}, o por formación de bases de Schiff entre grupos amino de la superficie y azúcares oxidados de la lacasa^{44, 89, 104}.

En esas condiciones, todos los autores reportan la presencia de uno o dos picos asociados a la transferencia electrónica directa no catalítica entre el electrodo y el centro T1 y/o T2/T3 de la lacasa. Sin embargo, a pesar de haber comunicación entre el electrodo y la enzima sólo Gupta y cols.⁴⁴ y Shleev y cols.⁸⁹ reportan la obtención de electrocatálisis directa de reducción de oxígeno en esas condiciones, a unos +50 mV para el caso de Gupta, y a +100 o +300 mV (vs. Ag/AgCl) en el trabajo de Shleev cuando la inmovilización se realiza sobre superficies de oro desnudas o funcionalizadas, respectivamente. Además, Shleev y cols.⁸⁹ demuestran que en presencia de fluoruros sólo se obtiene catálisis a +100 mV en ambos casos. Por lo tanto, los autores proponen que esta última catálisis es debida a un mecanismo en el cual no interviene el centro T1, que se inhibiría en presencia de fluoruros, siendo el centro T2/T3 el que recibe los electrones del electrodo y los transmite al oxígeno, obteniendo una reducción parcial que da como resultado la producción de peróxido de hidrógeno^{80, 89}. Por otra parte, la catálisis observada a +300 mV fue atribuida al centro T1. También observaron que los potenciales de reposo de electrodos de oro modificados con lacasa eran menores que los obtenidos para electrodos de grafito, lo que indica que la transferencia electrónica directa (TED) entre la lacasa y la superficie de oro no es tan eficiente o que el mecanismo de la reacción es más complicado en comparación con el mecanismo de TED con superficies de grafito⁸⁹.

Debido a los buenos resultados obtenidos en la presente tesis uniendo la lacasa covalentemente mediante enlace amida a electrodos de grafito funcionalizados con una monocapa de grupos amino, se utilizó la misma metodología para la unión de la enzima lacasa a superficies de oro funcionalizadas con el fin de obtener corrientes catalíticas directas (CCD) a través del centro T1 sobre esos soportes.

4.3.1. Electrodo tridimensional

Durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Sergey Shleev de la Universidad de Malmo tuve la posibilidad de trabajar con un nuevo material desarrollado por el grupo del Prof. Thomas Laurell (*Department of Electrical Measurements, Lund University, Lund, Suecia*): electrodos de oro tridimensionales obtenidos recubriendo superficies de silicio poroso con una monocapa de oro.

Estos electrodos se consideraron buenos candidatos para la obtención de corrientes catalíticas directas (CCD) en oro, puesto que pueden considerarse superficies porosas de oro, análogas a los electrodos de carbono porosos (LDG y SPG), las únicas superficies de grafito en las que se obtuvieron CCD relevantes.

Durante la redacción de la presente tesis se han publicado dos trabajos sobre la obtención de CCD con lacasa inmovilizada en otros dos tipos de oro poroso:

- a) Electrodos nanoporosos de oro obtenidos por Qiu y cols.⁸¹ a partir de aleaciones de oro/plata por disolución de la plata en ácido nítrico.
- b) Electrodos macroporosos de oro obtenidos por Gao y cols.⁴² por electrodeposición de oro en la superficie de nanopartículas de silicio que posteriormente son disueltas.

4.3.1.1. Caracterización de los electrodos

El silicio poroso (PSi) usado para la fabricación de los electrodos de oro tridimensionales fue caracterizado por el grupo del profesor Thomas Laurell mediante SEM, observándose una estructura tridimensional fractal, con microporos de 10 μm de profundidad combinados con nanoporos de 50-300 nm (figura 4.49).

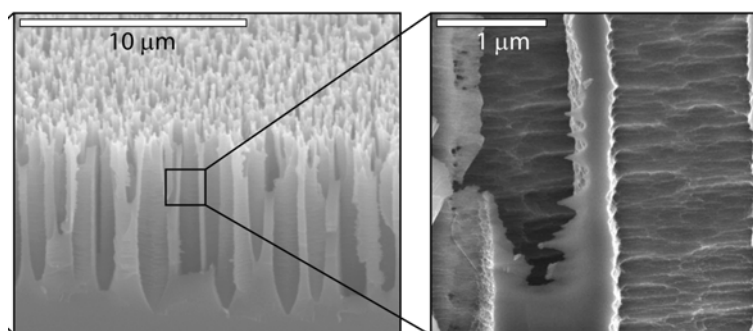


Figura 4.49. Imagen SEM de la estructura tridimensional de silicio poroso. Pueden observarse microporos de 10 μm de profundidad (izquierda) sobre los que se combinan nanoestructuras de 50-300 nm (derecha).

Los electrodos de oro tridimensionales (3D PSi), obtenidos recubriendo el silicio poroso con una monocapa de oro, se caracterizaron electroquímicamente mediante voltametría cíclica tanto en ácido sulfúrico como con ferricianuro potásico. Así mismo, los resultados obtenidos se compararon con electrodos planos, obtenidos recubriendo láminas de silicio no porosas, y con electrodos de disco comerciales de BAS. Los VCs obtenidos en H_2SO_4 (figura 4.50.a) presentan la forma típica para el oro, observándose un pronunciado pico catódico a un potencial de unos +900 mV que corresponde con la reducción de los óxidos de oro. La electroquímica de ferricianuro (figura 4.50.b) también presenta la forma típica para una especie reversible controlada por difusión, variando linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (figura 4.50.b, inserto).

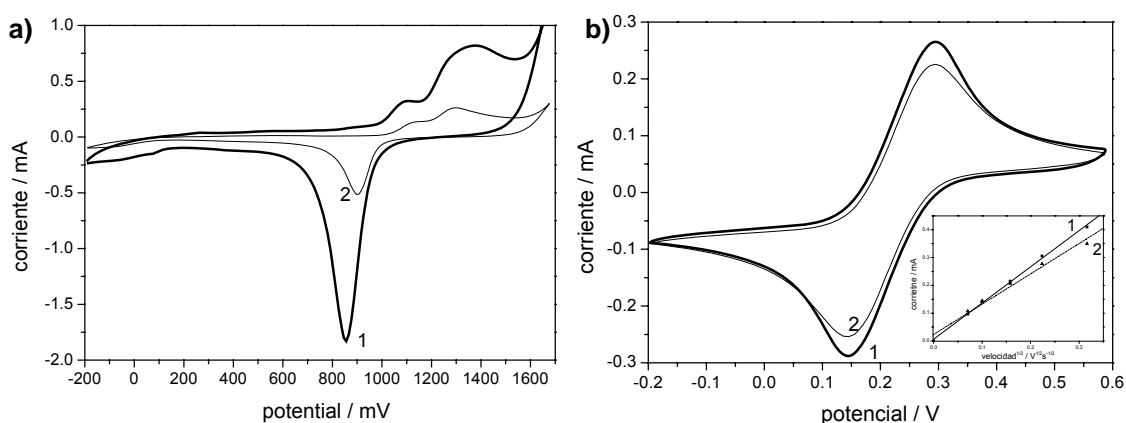


Figura 4.50. Caracterización electroquímica de los electrodos de oro 3D PSi 40 nm (1) y plano PSi 10 nm (2). **a)** VCs en H_2SO_4 0,5 M, 100 mV/s; **b)** VCs en $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CM})_6]$ 5 mM, 50 mV/s. Inserto, dependencia de la densidad de corriente (pico anódico) con la raíz cuadrada de la velocidad.

En la tabla 4.23 se recogen el área microscópica (A_{mic}), calculada a partir del VC en H_2SO_4 0,5 M; el área geométrica (A_{geo}), calculada a partir del VC en presencia de ferricianuro 1 mM a 25 mV s^{-1} ; el factor de rugosidad (f), calculado como el cociente entre el área microscópica y la geométrica; y el potencial formal (E') y la separación de picos (ΔE_p) obtenidos para el VC del ferricianuro a 25 mV s^{-1} , de todos los electrodos probados en el estudio: electrodos de disco comerciales de BAS, electrodos planos de silicio no poroso (plano Si) recubiertos con 10 o 40 nm de oro, y electrodos tridimensionales de silicio poroso (3D PSi) recubiertos con 10 o 40 nm de oro.

Electrodo	A_{mic} cm^2	A_{geo} cm^2	f	E' mV	ΔE_p mV
disco (BAS)	$0,05 \pm 0,01$	$0,019 \pm 0,003$	$2,2 \pm 0,3$	219 ± 3	88 ± 3
plano Si (10 nm)	$0,68 \pm 0,20$	$0,30 \pm 0,05$	$2,3 \pm 0,5$	206 ± 4	172 ± 29
plano Si (40 nm)	$1,03 \pm 0,16$	$0,31 \pm 0,03$	$2,9 \pm 0,4$	215 ± 3	161 ± 34
3D PSi (10 nm)	0,07	/	/	/	/
3D PSi (40 nm)	$3,00 \pm 1,01$	$0,35 \pm 0,13$	$8,6 \pm 3,3$	216 ± 8	137 ± 44

Tabla 4.23. Caracterización de los electrodos. Valores calculados a partir de tres experimentos independientes.

Como puede verse, cuando se recubrió el silicio plano, tanto con 10 como con 40 nm de oro, la totalidad de la superficie fue electroactiva, lo que indica un recubrimiento de oro completo. Además la rugosidad de este tipo de electrodos planos fue similar a la obtenida para los electrodos de disco de BAS. Sin embargo, la estabilidad de los electrodos planos, especialmente de los recubiertos con 40 nm de oro, resultó ser muy baja debido a la exfoliación de las capas de oro, por lo que estos electrodos no pudieron ser usados para más de una medida. Respecto a los electrodos tridimensionales, lo primero que cabe resaltar es que cuando se recubrió el silicio poroso con 10 nm de oro no se obtuvo señal electroquímica de ferricianuro, y el área microscópica calculada fue muy inferior a la geométrica. Esto puede ser debido a que la cobertura de oro no es homogénea, presentando gran cantidad de cavidades no recubiertas que impiden la comunicación electrónica a lo largo del electrodo. Por otro lado, cuando el recubrimiento se realizó con 40 nm de oro, puede observarse un aumento de más de ocho veces en el área microscópica respecto a la geométrica, un valor inferior al esperado para una estructura fractal. Además, estos electrodos aportan un área microscópica tres veces superior a los electrodos planos, la mitad del incremento observado por Gao y cols.⁴² para electrodos de oro tridimensionales macroporosos. Estos datos parecen indicar que se ha perdido la estructura nanoporosa. Aún así, la rugosidad que presentan estos electrodos de oro tridimensional es comparable a la obtenida para los electrodos de grafito de baja densidad (LGD, $f = 6,5 \pm 1,8$). Además, los electrodos tridimensionales recubiertos con 40 nm de oro presentaron una alta estabilidad, pudiendo incluso ser reutilizados puesto que mantuvieron sus

propiedades tras realizar una limpieza electroquímica barriendo el potencial redox en KOH y H₂SO₄.

4.3.1.2. Respuesta electrocatalítica

Para el estudio de la respuesta electrocatalítica de la enzima lacasa en los electrodos 3D PSi se intentaron reproducir las condiciones de funcionalización utilizadas con los electrodos de grafito (monocapa de aminofenilos, enlace amida). Por ello se modificaron los electrodos de oro con una monocapa autoensamblada (SAM) de 4-aminotiofenol, que aporta un grupo amino terminal a un anillo aromático que se encuentra unido covalentemente al electrodo a través del grupo tiol (figura 4.51). La inmovilización de la lacasa se realizó mediante formación de enlace amida entre los grupos amino de la monocapa y los grupos carboxilo de la lacasa, usando NHS y EDC para activar estos últimos⁹⁵ (figura 4.51).

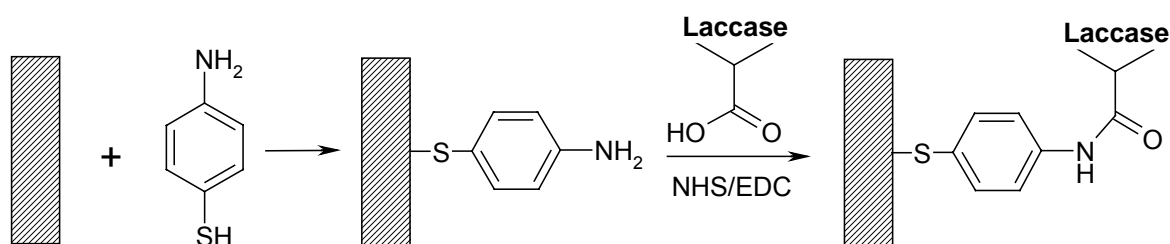


Figura 4.51. Esquema de la inmovilización de enzima lacasa en los electrodos de oro.

A diferencia de los resultados obtenidos en electrodos de grafito y los reportados en la literatura para otros electrodos de oro poroso^{35, 81}, en este caso no se obtuvo CCD ni en los electrodos planos ni en los tridimensionales. Esto puede ser debido a que, como ya se ha comentado en la caracterización de la superficie, la estructura nanoporosa del silicio, en la que podría alojarse la lacasa facilitando la transferencia electrónica, se ha perdido durante el proceso de recubrimiento con oro. Así para la lacasa de *T. versicolor*, Qiu y cols.⁸¹ reportan la obtención de CCD en estructuras nanoporosas de oro, mientras que Deng y cols.³⁵, que reportan CCD en una estructura macroporosa, incluyen nanopartículas de oro entre las lacasas.

En la figura 4.52 pueden verse los VC para un electrodo 3D PSi recubierto con 40 nm de oro. En ausencia de mediador no se obtuvo CCD ni se observaron picos atribuibles a TED entre los centros redox de la lacasa y el electrodo (figura 4.52, curva 1). Al añadir ABTS como mediador se obtuvo CCM, que fue inhibida completamente mediante la adición de fluoruros en el medio (figura 4.52, curvas 2 y 3).

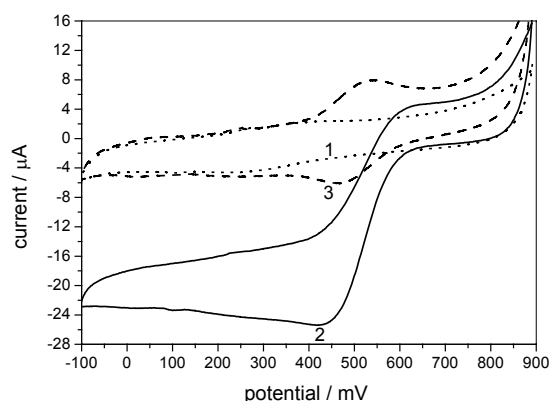


Figura 4.52. VCs obtenidos a 10 mV s^{-1} en acetato 50 mM NaClO_4 100 mM pH 4,2 saturado en aire para un electrodo de oro 3D Psi, funcionalizado con una SAM de 4-aminotiofenol, sobre el que se ha inmovilizado covalentemente la lacasa de *Trametes hirsuta*: en ausencia de ABTS (1); en presencia de ABTS 0,2 mM (2); en presencia de ABTS 0,2 mM y fluoruro 10 mM (3).

La diferencia en las CCMs obtenidas en los electrodos 3D PSi se correlaciona con la variación en la rugosidad que presentan, cercana al 33% (tabla 4.24). Los valores medios de CCM obtenidos para los electrodos tridimensionales y planos son 43 y $7 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ respectivamente (tabla 4.24), siendo el aumento de CCM ligeramente superior al aumento de la rugosidad media. Como electrodos planos de referencia se usaron electrodos de disco de BAS, debido a su mayor estabilidad respecto a los electrodos planos PSi.

3D PSi			plano BAS	
f	CCM $\mu\text{A cm}^{-2}$		f	CCM $\mu\text{A cm}^{-2}$
12,1	-53		2,4	-7,6
8,0	-47		1,9	-6,3
5,5	-30		2,4	-7,4
valor medio	$8,6 \pm 3,3$	-43 ± 12	$2,2 \pm 0,3$	$-7,1 \pm 0,7$

Tabla 4.24. Variación de la CCM obtenida en VC a 200 mV en presencia de ABTS 0,2 mM en los electrodos de oro 3D PSi y los planos de BAS, sobre los que se ha inmovilizado de forma covalente la enzima lacasa, en función de la rugosidad (f) de los mismos.

Es importante destacar que, cuando las medidas se realizaron bajo agitación fuerte, ni las corrientes obtenidas ni la forma del voltamperograma sufrieron variaciones. Esto indica que las medidas no se encuentran limitadas por el aporte de

oxígeno, lo que no es de extrañar debido al alto coeficiente de difusión del mismo, $19,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Sin embargo, como ya se vio para los electrodos de grafito (apartado 4.2.4.7), la concentración de oxígeno sí puede ser limitante, puesto que las medidas se han realizado en disolución saturada en aire, con una concentración de oxígeno por debajo de la $K_M^{\text{O}_2}$ de la enzima. Por lo tanto, cabe esperar que si se realizaran medidas en condiciones de saturación de oxígeno las corrientes obtenidas fueran mayores. Desafortunadamente, dichas medidas no se pudieron realizar por no disponer de él en el laboratorio de la Universidad de Malmö.

4.3.1.3. Estabilidad

La estructura porosa de los electrodos tridimensionales podría estabilizar la lacasa respecto a la desnaturalización, una de las mayores causas de inactivación de la enzima en oro, debido al confinamiento de la misma en un pequeño espacio inerte¹⁰⁶. Por ello, se realizaron estudios comparativos de estabilidad a tiempos largos entre electrodos tridimensionales y planos funcionalizados con enzima. Las medidas se realizaron midiendo de forma discontinua la CCM obtenida en voltametría cíclica a 200 mV en presencia de ABTS 0,2 mM, guardando el electrodo en tampón de medida a temperatura ambiente entre medidas. Ambos tipos de electrodos, planos y tridimensionales, presentaron similar estabilidad para la CCM, reteniendo un 50% de actividad después de dos días (figura 4.53). El hecho de que la estabilidad de la enzima no mejore en estas condiciones puede deberse a que la estructura nanoporosa, en la que se estabilizaría la enzima, se pierde al realizar el recubrimiento con oro, como ya se ha discutido en la caracterización de los electrodos.

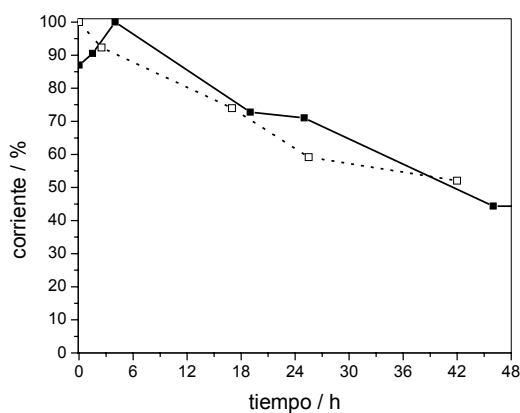


Figura 4.53. Estabilidad de la CCM obtenida para los electrodos de oro de disco (.....□.....) y 3D PSi 40 nm (—■—) modificados con enzima covalentemente unida a una SAM de 4-aminotiofenol.

4.3.2. Electrodos de disco de oro

Debido a los resultados negativos en cuanto a la medida de CCD obtenidos con los electrodos tridimensionales, se procedió al estudio de otras monocapas de tioles sobre electrodos planos.

Ambas monocapas (aminofenilos/hidroxilaminofenilos y aminofenoles) usadas con los electrodos de grafito descritos en el capítulo anterior presentan grupos OH en su estructura que pueden favorecer la orientación de la lacasa mediante formación de puentes de hidrógeno. Por lo tanto, los electrodos de disco de oro, previamente limpiados y pulidos, se funcionalizaron con diferentes tioles (figura 4.54) formando monocapas puras o mixtas que aportan a la superficie grupos NH_2 o/y OH. La inmovilización del enzima se realizó mediante adición de NHS y EDC para favorecer la formación de enlace amida.

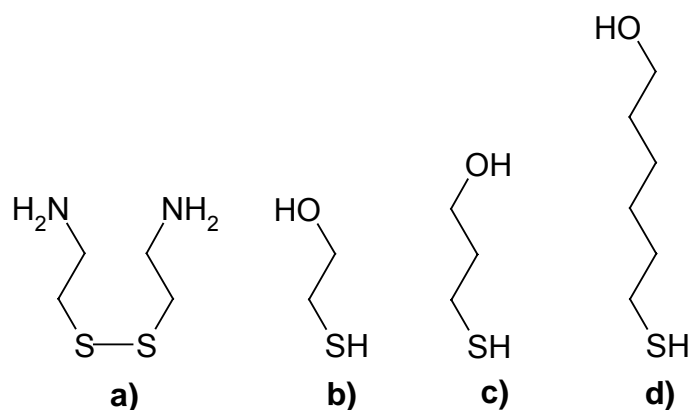


Figura 4.54. Distintos tioles utilizados para la funcionalización de las superficies de oro. **a)** cistamina; **b)** mercaptoetanol; **c)** mercaptopropanol; **d)** mercaptohexanol.

En la tabla 4.25 se resumen las distintas monocapas usadas para la funcionalización de los electrodos de disco de oro, así como la CCM obtenida con ellos tras la inmovilización covalente de la enzima. Las CCMs obtenidas (entre -10 y $-20 \mu\text{A cm}^{-2}$) son superiores a las obtenidas con la monocapa de 4-aminotiofenol ($-7 \mu\text{A cm}^{-2}$) debido a que en este caso las medidas se realizaron en condiciones de saturación de oxígeno, por lo que su concentración no es limitante. En comparación con las corrientes electrocatalíticas mediadas (CCM) reportadas en la bibliografía, las corrientes obtenidas son superiores a las obtenidas por Klis y cols.⁵³ con solo $-1,5 \mu\text{A cm}^{-2}$ usando ABTS como mediador cuando inmovilizaron la lacasa de *Cerrena unicolor* mediante enlace amida en una SAM de ácido mercaptopropionico. Por otro lado, Gupta y cols.⁴³ obtienen $-125 \mu\text{A cm}^{-2}$ usando catecol $0,2 \text{ mM}$ como mediador, aunque en este caso hay

que tener en cuenta que la cantidad de enzima inmovilizada en el electrodo debe ser superior a la reportada en la presente tesis, puesto ellos llevan a cabo la inmovilización depositando sobre el electrodo una mezcla de lacasa y glutaraldehído repetidamente, lo que dará lugar a la formación de multicapas de enzima.

monocapa	Condiciones formación	CCM $\mu\text{A cm}^{-2}$
cistamina	1 mM, agua, 15 h	-10,5
mercaptohexanol	1 mM, etanol:agua, 18h	-18,6
mercaptopropanol	1 mM, etanol:agua, 18h	-17,5
mercaptoetanol	1 mM, etanol:agua, 18h	-10,0
1:1 C:M	1 mM, etanol:agua, 18h	-20,7
1:3 C:M	1 mM, etanol:agua, 18h	-10,3
3:1 C:M	1 mM, etanol:agua, 18h	-16,0

Tabla 4.25. Distintas monocapas probadas para la inmovilización de *Trametes hirsuta* en oro usando NHS y EDC. La CCM fue medida a 200 mV en el voltamograma cíclico obtenido en acetato 50 mM NaClO₄ 100 mM saturado en oxígeno, en presencia de 0,2 mM ABTS y corregida por la corriente obtenida en presencia de fluoruros (C=10 mM). C:M corresponde a una monocapa mixta de cistamina:mercaptoetanol en la proporción indicada.

La mayor CCM se obtiene cuando el electrodo se encuentra funcionalizado con una monocapa mixta cistamina:mercaptoetanol en proporción 1:1 (figura 4.55.b). Sobre esa monocapa mixta se obtiene, además, una pequeña corriente electrocatalítica directa (CCD) de $-1,2 \pm 0,4 \mu\text{A cm}^{-2}$ (media de tres experimentos) (figura 4.55.a). Dicha catálisis es muy pequeña en comparación con las obtenidas por Shleev y cols.⁸⁹, $-100 \mu\text{A cm}^{-2}$, y Gupta y cols.⁴⁴, $-300 \mu\text{A cm}^{-2}$. Sin embargo, en esta tesis la catálisis se inicia a +500 mV, un potencial superior a los +310 mV y +100 mV respectivamente atribuidos a CCD por dichos autores y, por tanto, es un resultado más favorable para un cátodo de reducción de O₂. Además, la adición de iones fluoruro al medio no inhibe totalmente la catálisis (figura 4.55.a). Por lo tanto, es posible que la CCD observada sea debida tanto a enzima orientada en el electrodo a través del centro T1 como a través del centro T2/T3. En este segundo caso la reducción de oxígeno seguiría un camino catalítico en el que no se encuentra involucrado el centro T1, generando peróxido de hidrógeno como resultado la reducción parcial del oxígeno⁸⁰. A pesar de que no se

detectó la presencia de H_2O_2 en la celda, no fue posible descartar su producción por parte de la lacasa, puesto que, dado que el volumen de la celda era elevado y la corriente obtenida muy baja, es posible que la concentración de peróxido producida fuera inferior al límite de detección de las técnicas usadas (10^{-6} M para el biosensor y 10^{-7} M para el método espectrofotométrico).

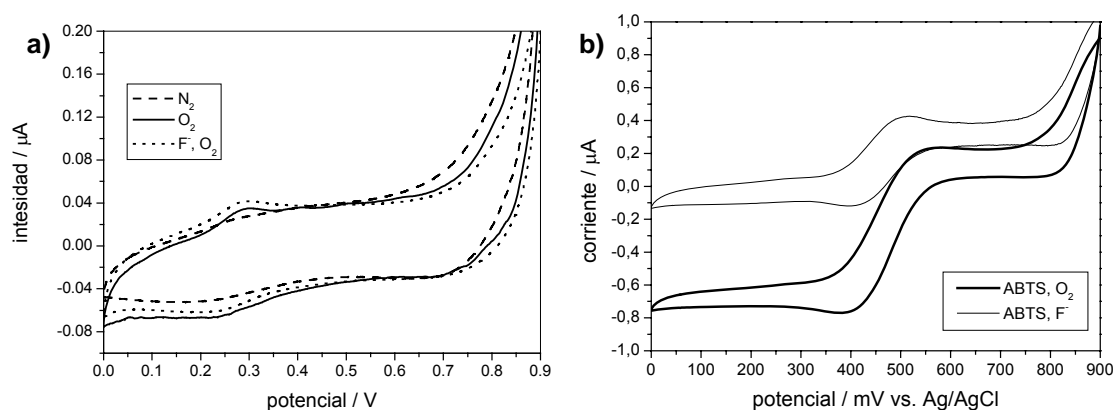


Figura 4.55. VCs obtenidos para una monocapa mixta cistamina:mercaptoetanol sobre la que se ha inmovilizado covalentemente la lacasa de *Trametes hirsuta* mediante enlace amida. a) CCD; b) CCM.

4.3.3. Nanopartículas de oro

Dadas las bajas corrientes catalíticas obtenidas en los electrodos de disco de oro, se consideró la posibilidad de aumentar la transferencia directa entre la lacasa y el electrodo mediante la inserción de nanopartículas de oro en el sistema, como ya se ha observado con la proteína redox citocromo c^{47} , y más recientemente con electrodos macroporosos de oro modificados con lacasa³⁵.

Se utilizaron nanopartículas de oro de 13 nm de diámetro estabilizadas con citrato suministradas por el Dr. Jose María Abad de la Universidad de Liverpool. La unión de la nanopartícula a la superficie de oro se realizó a través del bifenil ditiol, que ofrece dos grupos sulfuro, uno para su anclaje a la superficie de oro y otro para unir las nanopartículas (figura 4.56). En una segunda etapa se cambió la funcionalización de la superficie de la nanopartícula por una monocapa mixta de cistamina/mercaptoetanol (figura 4.56).

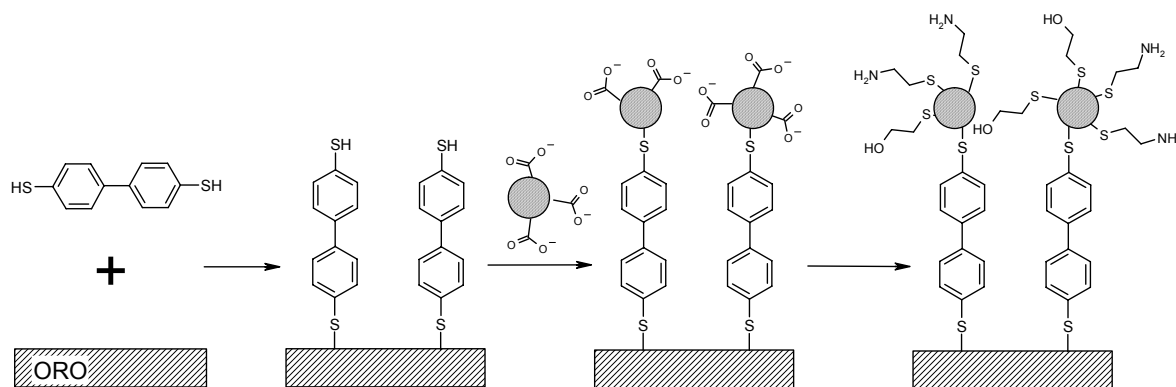


Figura 4.56. Funcionalización de electrodos de oro con nanopartículas de oro.

En la figura 4.57 pueden verse los VCs obtenidos para cada etapa de la funcionalización del electrodo de oro usando ferricianuro potásico como sonda electroquímica. La funcionalización de la superficie con la monocapa de difenil ditio conllevó al bloqueo de la misma, desapareciendo la señal del ferricianuro en VC. La causa de este bloqueo debe ser la formación de una monocapa muy compacta a través de interacciones atractivas π -resonantes entre anillos aromáticos vecinos. Una reorganización posterior de la monocapa de difenil ditio, producida por la adición de las nanopartículas, probablemente la haría menos compacta y, en consecuencia, cabría esperar que perdiera sus propiedades de bloqueo del proceso redox del ferricianuro. Sin embargo, la señal electroquímica de ferricianuro no se recuperó tras la incubación en las nanopartículas, lo cual se puede explicar debido a que éstas se encontraban recubiertas por una monocapa de citrato, que se encontrará cargada negativamente al pH de medida 4,2 (figura 4.56), produciendo la repulsión electroquímica del ferricianuro, cargado positivamente, lo que le impide llegar a la superficie electródica. De acuerdo con esta hipótesis, cuando se cambió la funcionalización de las superficies de las nanopartículas por una monocapa 1:1 de cistamina:mercaptoetanol (figura 4.56) se recuperó la señal electroquímica del ferricianuro (figura 4.57 curva 4) ya que en estas condiciones no existe repulsión electrostática y, como se ha comentado antes, la monocapa de difenil ditio es menos bloqueante tras la adición de las nanopartículas.

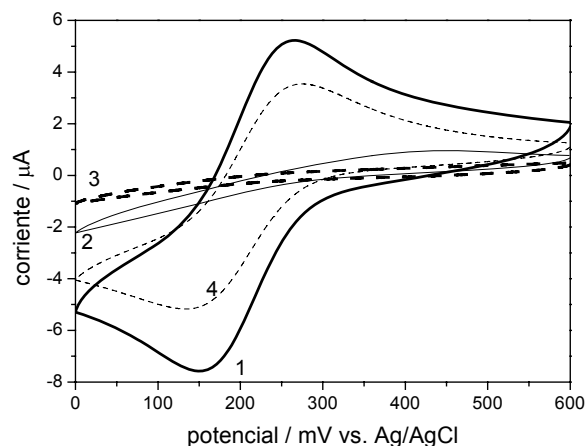


Figura 4.57. VCs de ferricianuro potásico obtenidos durante los distintos pasos de funcionalización de un electrodo de oro con nanopartículas: **1.** electrodo desnudo; **2.** monocapa de bifenilo ditiol; **3.** nanopartículas recubiertas de citrato; **4.** nanopartículas recubiertas de cistamina:mercaptoetanol 1:1.

Tras la inmovilización de la lacasa en la superficie modificada con nanopartículas, se obtiene una pequeña CCD ($> -1 \mu\text{A cm}^{-2}$) que comienza a $+550 \text{ mV}$ alcanzando enseguida un plató (figura 4.58.a). Sin embargo, cuando se realizaron blancos control, en los que la superficie se funcionalizó sólo con la monocapa de bifenilo ditiol, se obtuvieron VCs similares (figura 4.58.b) y corrientes del mismo orden, $-0,8 \pm 0,4 \mu\text{A cm}^{-2}$ para la CCD y $-9 \pm 2 \mu\text{A cm}^{-2}$ para la CCM. Estos resultados parecen indicar que las corrientes obtenidas son debidas a la inmovilización por atracción hidrofóbica de la enzima lacasa en la monocapa de difenilos, de forma similar a la descrita por Blanford y cols. en superficies de carbono¹⁸. A diferencia de lo que ocurría cuando la inmovilización se llevó a cabo en monocapas mixtas de cistamina:mercaptoetanol (figura 4.55.a), en este caso las corrientes directas obtenidas alcanzan un plató a altos potenciales, lo que parece indicar que la catálisis en este caso se debe exclusivamente a lacasa orientada con el centro T1 hacia el electrodo. A pesar de las bajas corrientes alcanzadas, el potencial al que se produce la catálisis ($+550 \text{ mV}$) es el más alto reportado en oro, con un valor cercano al obtenido en superficies de grafito ($+600 \text{ mV}$), por lo que el mecanismo de transferencia electrónica entre el centro T1 y el electrodo en este caso debe ser similar.

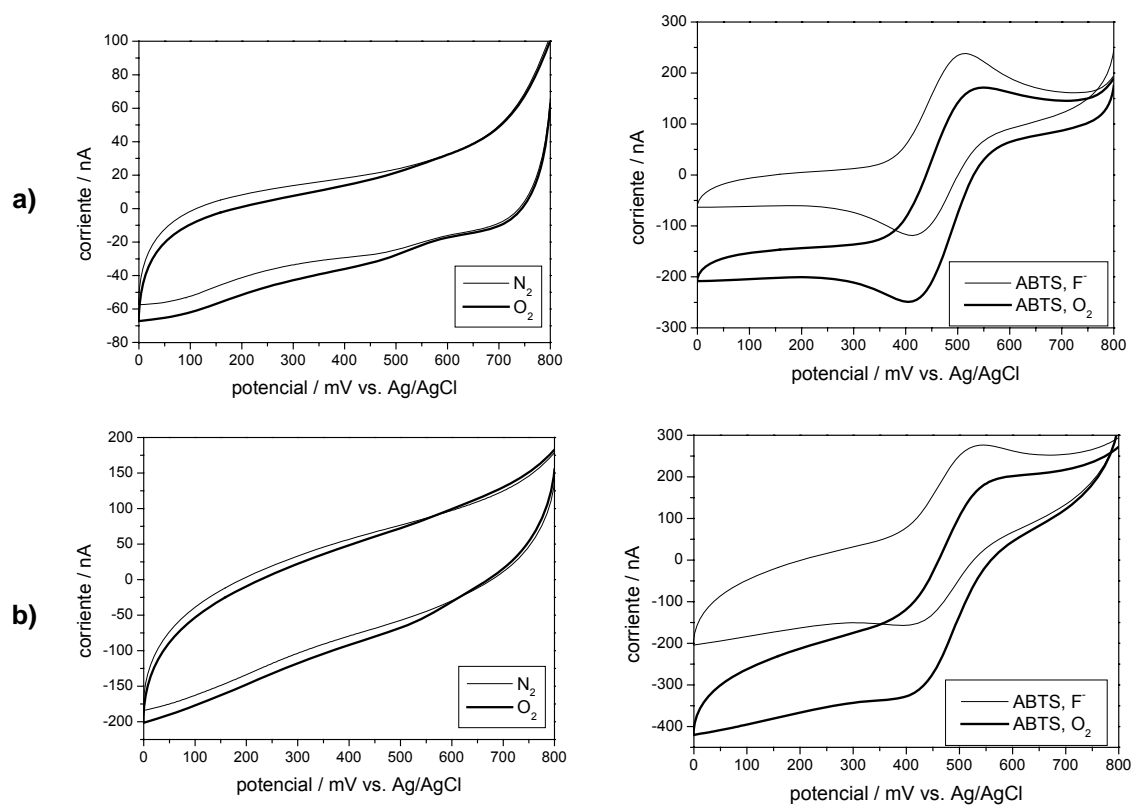


Figura 4.58. VCs de las corrientes directa (izquierda) y mediada (derecha) obtenidas para la enzima lacasa inmovilizada en: **a)** electrodo de oro funcionalizado con SAM de difenil ditiol sobre la que se han inmovilizado nanopartículas de oro recubiertas con una SAM de cistamina:mercaptoetanol; **b)** electrodo de oro funcionalizado con una SAM de difenil ditiol.

4.4. Diseño de una biopila de combustible enzimática basada en la transferencia electrónica directa entre enzima y electrodo

Las pilas de combustible enzimáticas basadas en la transferencia electrónica directa poseen una gran importancia debido a la simplicidad de su construcción, a la posibilidad de miniaturizarlas y a la ausencia de mediadores, por lo que se consideran no tóxicas pudiendo usarse para desarrollar micro-baterías implantables en el torrente sanguíneo de mamíferos¹³.

En este apartado describe la caracterización de una pila de combustible basada en la oxidación enzimática de diversos azúcares en el ánodo y la reducción enzimática de oxígeno en el cátodo, ambas mediante transferencia electrónica directa. Este diseño es muy atractivo para las baterías implantables, puesto que los sustratos necesarios para su funcionamiento se encuentran presentes en la mayoría de fluidos biológicos.

4.4.1. Bioánodo enzimático

El bioánodo utilizado en la biopila fue desarrollado por el grupo del Prof. Lo Gorton (Departamento de Química Analítica, Universidad de Lund, Suecia) mediante la fisisorción de celobiosa deshidrogenasa (CDH) en electrodos de grafito espectroscópico (SPG), obteniendo un bioánodo enzimático capaz de oxidar azúcares sin necesidad de mediadores y cuyo pH óptimo de trabajo es 5,0⁵⁴.

La CDH contiene dos subunidades, una flavina y un citocromo b, cuyos centros activos son un dinucleótido de flavina adenina (FAD) y un grupo hemo b (figura 4.59). La oxidación de la celobiosa, u otros azúcares, a su correspondiente lactona tiene lugar en el dominio FAD. Mientras que la reoxidación de la CDH depende del sustrato que se use como receptor de electrones, produciéndose preferiblemente en el dominio FAD con receptores bielectrónicos y en el dominio hemo con receptores monoelectrónicos⁵⁴ (figura 4.59).

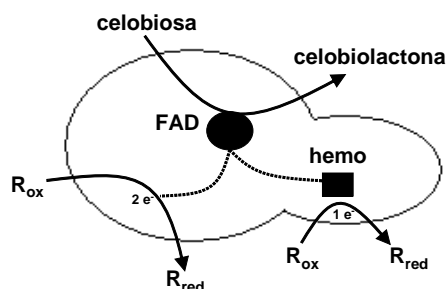


Figura 4.59. Esquema de la catálisis de la CDH. R representa el receptor de electrones.

En las curvas de polarización puede observarse que, cuando la CDH se encuentra adsorbida en electrodos de grafito, la catálisis enzimática comienza a -125 mV, con un potencial de onda media de unos -50 mV (figura 4.60). El potencial redox del grupo hemo a pH 4,5 es de unos -30 mV⁵⁴, lo que pone de manifiesto que es este grupo el que se encuentra en transferencia directa con el electrodo.

Las corrientes catalíticas alcanzadas varían en función del azúcar presente en el medio (figura 4.60), siendo mayores para lactosa y celobiosa que para glucosa, de acuerdo con la especificidad de sustrato encontrado para distintas CDHs²⁶. Así mismo, el potencial a circuito abierto de los electrodos modificados con CDH disminuye en presencia de los azúcares (tabla 4.26), debido a la oxidación bioelectrocatalítica de los sustratos por parte de la enzima.

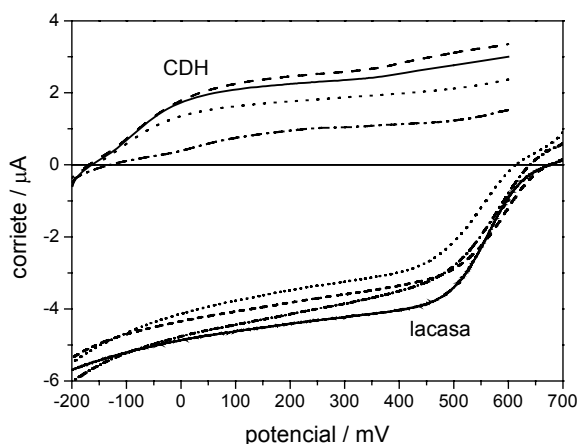


Figura 4.60. Curvas de polarización de los electrodos modificados con CDH y lacasa. Tampón citrato-fosfato 0,1 M pH 4,5, solo (---) o conteniendo 5 mM de glucosa (.....), lactosa (---) o celobiosa (—). Disolución saturada en aire.

En la figura 4.61 se puede ver la estabilidad del bioánodo diseñado cuando se polarizó el electrodo modificado con CDH a 50 mV en presencia de glucosa. Como

puede observarse, durante los primeros minutos la pérdida de señal es muy importante, manteniéndose más estable tras 10 minutos. En condiciones de agitación (800 rpm) la estabilidad de la corriente es aún menor. Esta falta de estabilidad es debida la débil unión de la CDH al electrodo, mediante adsorción física, lo que conlleva la desorción de la enzima. No obstante, hay que tener en cuenta que el agotamiento de sustrato también contribuye a la pérdida de señal, puesto que éste no es repuesto en la celda de medida.

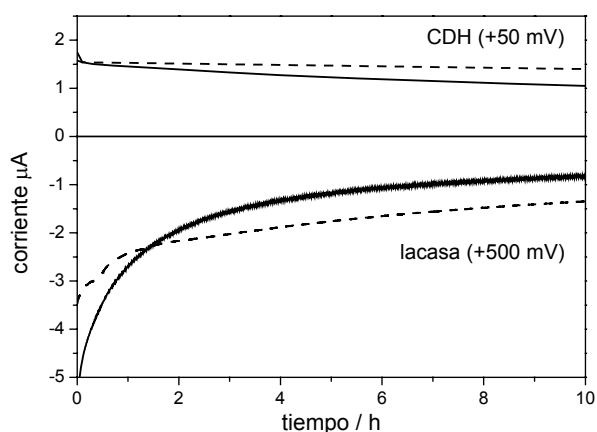


Figura 4.54. Estabilidad de la corriente de los electrodos modificados con CDH y lacasa en presencia de 5 mM de glucosa cuando la medida se realizó en reposo (---) o agitando la disolución a 800 rpm (—). Entre paréntesis el potencial aplicado para cada electrodo en la CA.

4.4.2. Biocátodo enzimático

El biocátodo enzimático usado en la construcción de la biopila de combustible se basa en la electroreducción enzimática directa de oxígeno a agua por parte la lacasa de *T. hirsuta* inmovilizada en electrodos de carbono. Aunque en la presente tesis se ha desarrollado un biocátodo enzimático que presenta altas corrientes y gran estabilidad debido a la inmovilización covalente y orientada de la lacasa en electrodos de carbono funcionalizados, para el desarrollo de la biopila se optó por un diseño más simple en el que la lacasa se encuentra fisisorbida sobre un electrodo desnudo de carbono. La elección de este diseño menos eficaz se debió a las limitaciones del ánodo diseñado en la Universidad de Lund (bajas corrientes, baja estabilidad).

Como era de esperar, el potencial a circuito abierto (tabla 4.26) y las corrientes límites de las curvas de polarización (figura 4.60) apenas se ven afectadas por la presencia de azúcares en el medio. Como ya se ha comentado a lo largo de la tesis, el potencial al que se produce la catálisis coincide con el potencial del centro T1 de la

lacasa (780 mV vs. NHE), puesto que es este centro el que se encuentra en transferencia directa con el electrodo. Debido a que las medidas se realizaron en tampón saturado en aire, las corrientes límites obtenidas se encuentran limitadas por la concentración de oxígeno, como ya se ha discutido en el apartado 4.2.5.7. Sin embargo, los valores obtenidos son superiores a las corrientes anódicas, por lo que es de esperar que la biopila se encuentre limitada por las corrientes anódicas y no por las catódicas.

Al igual que se había observado para el ánodo, la estabilidad de la corriente, obtenida al polarizar el electrodo modificado con lacasa a 500 mV, disminuye drásticamente en los primeros minutos debido a la desorción de enzima del electrodo y al agotamiento de sustrato. También en este caso la estabilidad es aún menor cuando la medida se lleva a cabo en condiciones de agitación (800 rpm) (figura 4.61).

4.4.3. Biopila de combustible

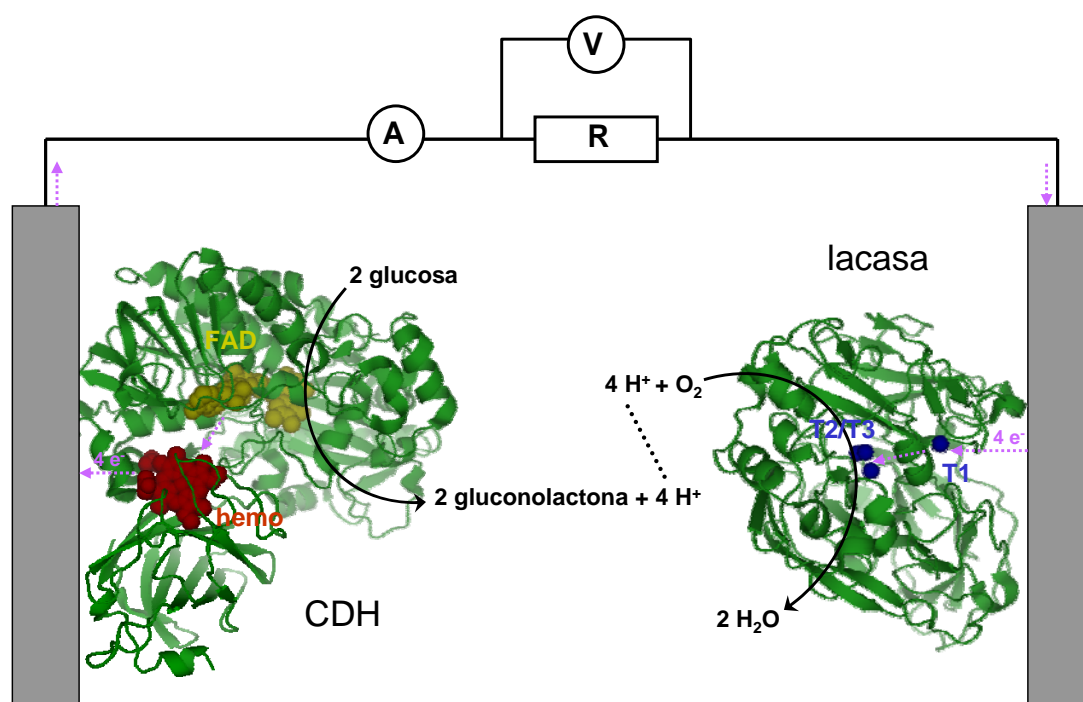
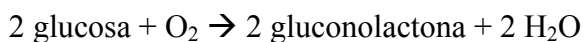


Figura 4.62. Esquema de la biopila de combustible enzimática. Las estructuras tridimensionales han sido modeladas con el programa PYMOL a partir de las estructuras de la lacasa de *T. versicolor* (archivo PDB 1GYC) y de la celobiosa deshidrogenasa de *Phanerochaete chrysosporium* (archivo PDB 1NAA y PDB 1D7D para los dominios FAD y hemo respectivamente). Los centros activos de ambas enzimas se encuentran resaltados en color.

La figura 4.62 representa un esquema de la configuración de la biopila de combustible enzimática. A grandes rasgos, en el bioánodo tiene lugar la oxidación del

azúcar, que transmite los electrones directamente al electrodo. Por otra parte, el biocátodo toma electrones directamente del electrodo, transmitiéndoselos a su vez al oxígeno molecular, que se reduce a agua. La reacción global de la biopila es,



Como las reacciones catalíticas en ánodo y cátodo son específicas y las condiciones óptimas de trabajo de ambas enzimas son similares no se requiere separar los electrodos en dos compartimentos, lo que simplifica el diseño de la biopila, abarata costes y evita que el transporte de protones a través de una membrana limite la intensidad de corriente de la pila.

Las medidas de caracterización de la biopila se realizaron en tampón citrato-fosfato 0,1 M pH 4,5, puesto que dicho pH es cercano al óptimo para ambas enzimas.

El voltaje a circuito abierto máximo de la biopila (V_p), calculado como la diferencia entre el potencial a circuito abierto del cátodo (E_c) y del ánodo (E_a), varía entre 730 y 770 mV (tabla 4.26) en función del azúcar usado, puesto que el potencial del bioánodo varía con el azúcar presente. La mayor diferencia de potencial se obtiene cuando el sustrato de la CDH es lactosa.

Azúcar	E_a	E_c	V_p
Ninguno	-50	650	700
Glucosa	-90	640	730
Celobiosa	-110	650	760
Lactosa	-115	655	770

Tabla 4.26. Potenciales a circuito abierto obtenidos en citrato-fosfato 100 mM pH 4,5. Disolución saturada en aire, concentración de azúcares 5 mM.

La fuerza electromotriz máxima a pH 4,5 para el par glucosa/ O_2 es 1,2 V, puesto que los potenciales formales de los pares glucosa/gluconolactona y $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ a pH 4,5 son -240 y + 960 mV vs. ENH respectivamente. Por otro lado, la diferencia entre los potenciales formales de los centros activos de las enzimas en comunicación con los electrodos, T1 de la lacasa (+780 mV vs. ENH) y hemo de la CDH (+150 mV vs. ENH aprox.), es de unos 630 mV. Por lo tanto el potencial a circuito abierto (tabla 4.26) es menor que la fuerza electromotriz máxima y algo mayor que la diferencia de potencial entre los centros redox de las enzimas, lo que indica una limitación cinética en la transferencia electrónica entre las enzimas y el electrodo⁵⁰.

En la figura 4.63 puede verse cómo la potencia de la pila varía en función del potencial para cada sustrato. La máxima potencia ($15,4 \mu\text{W cm}^{-2}$) se obtiene cuando el sustrato es lactosa, siendo el voltaje de la pila en ese caso 550 mV. Cuando se usa celobiosa como sustrato la biopila alcanza una potencia máxima de $12,0 \mu\text{W cm}^{-2}$ a 555 mV. La menor potencia se obtiene cuando se usa glucosa como sustrato, alcanzando en este caso una potencia máxima de $5,4 \mu\text{W cm}^{-2}$ para un voltaje de entre 360 y 510 mV.

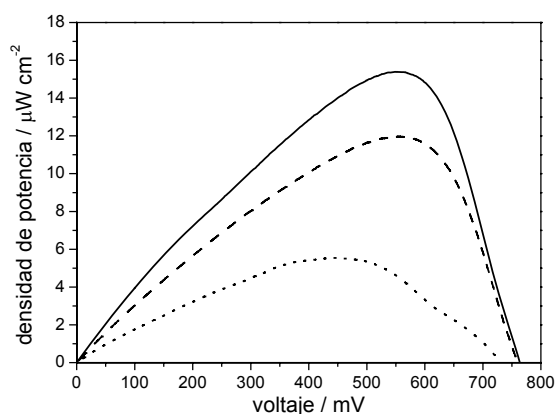


Figura 4.63. Potencia de la pila en función del voltaje medido en disolución saturada en aire de citrato-fosfato 0,1 M pH 4,5 conteniendo 5 mM de lactosa (—), celobiosa (---) o glucosa (.....). La densidad de potencia se ha calculado como el producto entre la densidad de corriente y el potencial obtenidos al realizar un VC a 1 mV s^{-1} en una configuración en la que el ánodo funciona como electrodo de trabajo y el cátodo como electrodo combinado de referencia y contraelectrodo. El área geométrica del electrodo fue de $0,07 \text{ cm}^2$.

La estabilidad en condiciones de trabajo de la pila (resistencia de $1 \text{ M}\Omega$) puede verse en la figura 4.64. La potencia inicial obtenida ($6,8 \mu\text{W cm}^{-2}$) fue la misma tanto cuando la disolución se encontraba en reposo como cuando era agitada a 800 rpm puesto que, como ya se ha comentado antes, ni el ánodo ni el cátodo se encuentran limitados por difusión de sustratos. La estabilidad de la señal fue mayor en la disolución no agitada, debido a que la desorción de las enzimas de la superficie se ve favorecida por la agitación de la disolución, como ya se había visto en la figura 4.61. Aunque no fue posible registrar la medida durante largo tiempo (días) por problemas técnicos, se puede considerar que a partir de dos horas de funcionamiento la pérdida de potencia es constante, por lo que la vida media de la pila será de unas 38 horas en la disolución no agitada y unas 22 horas cuando la medida se realiza bajo agitación a 800 rpm.

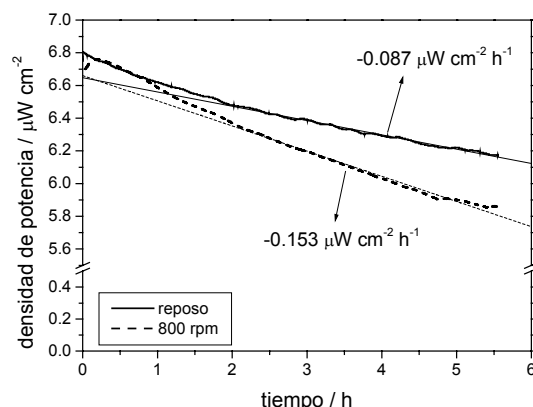


Figura 4.64. Estabilidad de la señal con el tiempo para una resistencia de 1 MΩ en presencia de 5 mM de lactosa tanto cuando la disolución se encuentra en reposo como agitada a 800 rpm. Las líneas finas representan el ajuste lineal a partir de dos horas de funcionamiento.

En la tabla 4.27 se recoge un resumen de las características, potencial a circuito abierto (E_p), potencia máxima (P) y tiempo de vida media operacional ($t_{1/2}$), de las biopilas de combustibles enzimáticas de un solo compartimento basadas en la transferencia directa entre enzima y electrodo que pueden encontrarse en la bibliografía. Como puede observarse, la biopila diseñada en el presente trabajo presenta una potencia que sólo es inferior a la diseñada por Kamitaka y cols.⁵⁰, pero la estabilidad reportada en esta tesis es muy superior, tan solo superada por la biopila de Ramanavicius y cols.⁸³ cuya potencia es más de diez veces inferior. Además, la optimización de la inmovilización y la orientación de CDH sobre electrodos de grafito, por métodos similares a los desarrollados en esta tesis para la lacasa, permitiría obtener una potencia de pila y una estabilidad operacional notablemente mejor.

Combustible	Ánodo / Cátodo	V mV	P $\mu\text{W cm}^{-2}$	$t_{1/2}$ h	referencia
H ₂ /O ₂	Hasa / Lac.	970	5	> 0,25	Vincent 2005 ¹⁰⁰
EtOH /glucosa	ADH / GO:MP	270	≈ 0,2	≈ 60	Ramanavicius 2005 ⁸³
Fructosa / O ₂	FDH / Lac.	790	850	> 12	Kamitaka 2007 ⁵⁰
Glucosa / O ₂	CDH / Lac.	730	> 5	> 38	Esta tesis

Tabla 4.27. Comparación de las características (voltaje (V), potencia (P) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$)) de las biopilas de combustible enzimáticas de un solo compartimento basadas en la transferencia electrónica directa. Enzimas usadas: hidrogenasa (Hasa), lacasa (lac.), alcohol deshidrogenasa (ADH), glucosa oxidasa (GO), microperoxidasa (MP), celobiosas deshidrogenasa (CDH).

5-. CONCLUSIONES

5.1. Caracterización de la enzima

A partir de un método basado en la espectrometría de masas se han podido calcular las constantes cinéticas de la enzima lacasa de *Trametes hirsuta* respecto al oxígeno. El valor de la constante de Michaelis obtenido ($K_M^{O_2} = 0,3 \text{ mM}$) indica que en condiciones de disolución saturada en aire ($C^{O_2} \approx 0,2 \text{ mM}$), el oxígeno se encuentra en concentración limitante, por lo que es preciso aumentar su concentración mediante borboteo de oxígeno para incrementar la señal catalítica de la lacasa.

5.2. Electrodos de carbono

La inmovilización covalente de la lacasa se realizó en superficies de carbono funcionalizadas con grupos amino mediante la reducción electroquímica de dos tipos de sales de diazonio, 4-nitrobenceno y 2-nitrofenol. Cuando se partió de la sal de diazonio 4-nitrobenceno se produjo la formación de multicapas mixtas de aminofenilos/hidroxilaminofenilos. Por otra parte, cuando la modificación se hizo partiendo de la sal de diazonio 2-nitrofenol se obtuvo una monocapa de aminofenoles cuyo recubrimiento correspondía a un 10 % del valor teórico calculado para monocapas de anillos fenólicos. A pesar del diferente recubrimiento, ambas monocapas han demostrado ser buenos soportes para la inmovilización covalente de la lacasa de *Trametes hirsuta*, obteniéndose corrientes catalíticas de reducción de oxígeno similares en ambos casos.

A partir de los estudios de optimización de la inmovilización mediante formación de enlace amida entre los grupos carboxílicos la lacasa y los grupos amino de los electrodos de carbono funcionalizados, se puede concluir que no es un solo tipo de interacción el que favorece la orientación de la lacasa en el electrodo para transferencia electrónica directa. Baja fuerza iónica y un pH ligeramente ácido, condiciones en las que se pueden producir interacciones electrostáticas entre la superficie cargada positivamente y la región de la lacasa cercana al centro redox T1 cargada negativamente, favorecen altas corrientes catalíticas de reducción de oxígeno con una mayor relación entre las corrientes directa y mediada. Sin embargo, también en otras condiciones de pH, en las que no es de esperar dichas interacciones, se obtienen corrientes importantes. Por lo tanto, no se puede descartar que otras interacciones como la formación de puentes de hidrógeno, entre residuos cercanos al centro T1 de la lacasa y los grupos amino de la monocapa, o interacciones hidrofóbicas, entre los anillos

aromáticos de la monocapa y de aminoácidos de la cavidad del centro T1 de la lacasa, jueguen también un papel importante en la orientación de la lacasa en el electrodo.

Respecto al tipo de carbono, hay que considerar que sólo se obtuvieron corrientes relevantes, tanto directas como mediadas, con los electrodos LDG y SPG. Dichos electrodos presentan una superficie electroactiva superior a los otros usados (GC y PG), sin embargo, el aumento de corriente observado es unas diez veces superior al aumento de superficie. Estos datos, junto con los estudios de porosimetría, parecen indicar que la estructura macroporosa de los electrodos LDG y SPG favorecen la accesibilidad de la enzima a la totalidad de la superficie electroactiva, a diferencia de lo que ocurre con los electrodos microporosos GC y PG.

La inmovilización covalente de la enzima se realizó de dos formas: mediante formación de enlace amida entre los grupos carboxílicos de la enzima y los grupos amino de las monocapas; y mediante formación de enlace imida o base de Schiff entre los grupos aldehído de los azúcares reducidos de la lacasa y los grupos amino de la monocapa. Para ambas inmovilizaciones el potencial al que se produce la catálisis (+800 mV *vs.* ENH) corresponde al del potencial del centro T1 (+780 mV *vs.* ENH), lo que indica que es la transferencia directa de electrones entre el electrodo y el centro T1 de la lacasa la responsable de la corriente catalítica.

Cuando la enzima se inmovilizó en el electrodo a través de formación de enlace amida la relación entre corriente directa y mediada fue de aproximadamente 0,5, mientras que la relación de corrientes fue prácticamente uno cuando la inmovilización se realizó mediante formación de base de Schiff. Además, en condiciones de catálisis directa no limitada por el aporte de O₂, el recubrimiento de lacasa catalíticamente activa es 2,5 veces mayor cuando la inmovilización se realiza mediante formación de base de Schiff. Estos datos indican que la inmovilización mediante formación de base de Schiff ofrece una mayor eficacia en la orientación de la lacasa que la inmovilización a través de enlace amida para medir transferencia electrónica directa. Sin embargo, cuando la inmovilización se realiza mediante formación de enlace amida, el voltamperograma medido en condiciones en las cuales el proceso catalítico directo no está limitado por el transporte del O₂ se ajusta mejor al modelo teórico en el cual todas las moléculas de lacasa capaces de transferir electrones directamente al electrodo tienen la misma orientación y, por tanto, su centro T1 se encuentra a la misma distancia al electrodo. En cambio cuando la inmovilización se realiza mediante formación de base de Schiff, la curva experimental se acerca más a un modelo en el que las moléculas de lacasa que

transfieren directamente con el electrodo no se encuentran todas orientadas de la misma forma, sino que existe una distribución que conlleva diferentes distancias entre el centro T1 y el electrodo. En resumen, cuando la inmovilización se realiza a través de los azúcares de la enzima (base de Schiff), se obtiene mayor recubrimiento de enzima con posibilidad de transferencia directa con el electrodo, pero su grado de orientación es menor que cuando la lacasa se orienta a través de los grupos carboxilatos (enlace amida). Esto se explica por que la distribución global de grupos carboxílicos en la lacasa es mayor que la distribución de azúcares (y por tanto las posibilidades de unión de forma no orientada son mayores), pero en la cercanía del centro T1 existen varias regiones ricas en azúcares (varias posibilidades de unión con TED), mientras solo hay una región rica en grupos carboxílicos cercana a ese centro (una sola posibilidad de unión con TED).

La estabilidad operacional del electrodo de lacasa para reducción de O_2 desarrollado en esta tesis mejora lo publicado hasta ahora, siendo los electrodos modificados mediante formación de enlace amida los que presentan una mayor estabilidad, debido a que las bases de Schiff se hidrolizan en medio acuoso. No obstante, la reducción de la base de Schiff mejora la estabilidad del electrodo sin afectar excesivamente a la capacidad de transferencia electrónica entre la lacasa y el electrodo.

Para ambos tipos de inmovilización se observó que los fluoruros inhibieron completamente la catálisis enzimática, tanto directa como mediada. Por su parte los cloruros inhibieron la catálisis mediada, aún a baja concentración, mientras que no inhibieron completamente la catálisis directa, aún a altas concentraciones (≈ 1 M). A partir de estos datos se ha postulado que, mientras que los fluoruros penetran en la estructura de la lacasa bloqueando el camino electrónico intramolecular entre los centros de cobre e impidiendo la catálisis enzimática, los cloruros bloquean la región de la lacasa en la que se une el sustrato impidiendo la catálisis mediada, pero no son capaces de penetrar tanto en la estructura como para bloquear la transferencia electrónica intramolecular.

A partir de todos estos datos se puede concluir que se han desarrollado electrodos enzimáticos que, optimizando la cantidad de enzima, presentan altas corrientes de reducción de oxígeno a un elevado potencial redox, gran estabilidad en condiciones de trabajo y resistencia a la presencia de cloruros, por lo que pueden usarse como biocátodos en una pila de combustible biológica.

Aunque este trabajo se ha centrado en la lacasa de *Trametes hirsuta*, los métodos de inmovilización se basan en la formación de enlace covalente con residuos presentes en su estructura (grupos carboxilatos y azúcares), comunes para la mayoría de las lacasas, por lo que se podría aplicar dichos métodos a otras enzimas que aporten ventajas adicionales al electrodo diseñado, como por ejemplo resistencia a pHs fisiológicos.

5.3. Electrodos de oro

A pesar de que la estructura macroporosa de los electrodos de carbono LDG y SPG favorece la transferencia electrónica directa entre la lacasa y el electrodo, no se observaron corrientes catalíticas directas cuando se usó una estructura porosa de oro (3D PSi). Este nuevo material, sin embargo, ofrece un área microscópica tres veces superior a los electrodos planos de oro convencionales, lo que se traduce en una mayor densidad de corriente catalítica mediada cuando la enzima lacasa se inmoviliza en electrodos de oro tridimensionales que cuando se usan electrodos de oro planos.

Aún usando electrodos tridimensionales, la densidad de corriente catalítica mediada obtenida fue unas quince veces inferior a las densidades obtenidas en electrodos de carbono, lo que pone de manifiesto la menor eficacia de las superficies metálicas para la reacción electroenzimática de reducción de O₂.

Las diferentes funcionalizaciones de la superficie de oro probadas apenas mejoraron la corriente catalítica. Sin embargo, cabe destacar que cuando la superficie se encontraba funcionalizada con una monocapa de difenil ditiol, en la que la lacasa se puede orientar por interacciones hidrofóbicas, se obtuvo una pequeña corriente catalítica directa que alcanzaba un plató a altos potenciales redox, de forma similar a como se había observado para las superficies de carbono. Por tanto, es posible que en este caso el mecanismo de transferencia electrónica entre el centro T1 y el electrodo sea similar al que se produce en superficies de carbono.

5.4. Biopila de combustible

Se ha desarrollado una biopila de combustible enzimática de azúcar/oxígeno con un diseño muy simple que no precisa la separación de cátodo y ánodo en compartimentos independientes ni la presencia de mediadores en el medio.

Las características de la biopila son un potencial a circuito abierto de entre 730 y 770 mV y una potencia máxima de entre 15,4 y 5,4 $\mu\text{W cm}^{-2}$ a un voltaje de trabajo de

unos 550 mV en citrato-fosfato 0,1 M pH 4,5 en presencia de concentraciones 5 mM de distintos azúcares (lactosa, fructosa o glucosa). Además se ha estimado que la vida media de la biopila es superior a 38 h para una resistencia externa de 1 M Ω .

Este diseño de biopila ofrece una base para el desarrollo de una pila de combustible enzimática que pueda usarse en sistemas bioelectrónicos, siendo preciso para ese cometido mejorar la estabilidad de las corrientes mediante la inmovilización covalente de las enzimas. En la presente tesis se han desarrollado metodologías que permiten la unión covalente de la lacasa de *Trametes hirsuta* en el electrodo con las que no sólo se impide la desorción de la enzima del electrodo a la vez que se retiene la capacidad de comunicación directa, sino que la corriente directa de reducción de oxígeno se aumenta considerablemente debido a la orientación de la lacasa en la superficie, obteniendo como resultado un cátodo más estable y eficaz. La aplicación de estrategias similares al ánodo enzimático redundará con toda probabilidad en el desarrollo de biopilas de combustible más estables y eficaces que puedan competir con las pilas de combustible convencionales basadas en electrocatalizadores de platino.

6-. BIBLIOGRAFIA

1. "Handbook of Chemistry y Physics", Florida (1990).
2. "Técnicas de análisis y caracterización de materiales", España (2002).
3. P. Allongue, M. Delamar, B. Desbat, O. Fagebaume, R. Hitmi, J. Pinson, y J.M. Saveant, *Covalent modification of carbon surfaces by aryl radicals generated from the electrochemical reduction of diazonium salts*, Journal of the American Chemical Society 119:201 (1997).
4. M.A. Alonso-Lomillo, O. Rudiger, A. Maroto-Valiente, M. Velez, I. Rodriguez-Ramos, F.J. Munoz, V.M. Fernandez, y A.L. De Lacey, *Hydrogenase-coated carbon nanotubes for efficient H₂ oxidation*, Nano Letters 7:1603 (2007).
5. M.A. Alonso, S. Sanllorente, L.A. Sarabia, y M.J. Arcos, *Optimization of the experimental parameters in the determination of rifamycin SV by adsorptive stripping voltammetry*, Analytica Chimica Acta 405:123 (2000).
6. C.P. Andrieux, F. Gonzalez, y J.M. Saveant, *Derivatization of carbon surfaces by anodic oxidation of arylacetates. Electrochemical manipulation of the grafted films*, Journal of the American Chemical Society 119:4292 (1997).
7. N. Anicet, C. Bourdillon, J. Moiroux, y J.M. Saveant, *Electron transfer in organized assemblies of biomolecules. Step-by-step avidin/biotin construction and dynamic characteristics of a spatially ordered multilayer enzyme electrode*, Journal of Physical Chemistry B 102:9844 (1998).
8. M. Arroyo, *Inmobilized enzymes: Theory, methods of study and applications*, Ars Pharmaceutica 39:23 (1998).
9. P. Baldrian, *Fungal laccases - occurrence and properties*, Fems Microbiology Reviews 30:215 (2006).
10. C.E. Banks y R.G. Compton, *Edge plane pyrolytic graphite electrodes in electroanalysis: An overview*, Analytical Sciences 21:1263 (2005).
11. B. Barbier, J. Pinson, G. Desarmot, y M. Sanchez, *Electrochemical bonding of amines to carbon-fiber surfaces toward improved carbon-epoxy composites*, Journal of the Electrochemical Society 137:1757 (1990).
12. A.J. Bard y L.R. Faulkner, "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications", New York (1980).
13. S.C. Barton, J. Gallaway, y P. Atanassov, *Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices*, Chemical Reviews 104:4867 (2004).
14. I. Bento, L.O. Martins, G. Gato-Lopes, M.A. Carrondo, y P.F. Lindley, *Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective*, Dalton trans. 3507:3513 (2005).
15. T. Bertrand, C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, y C. Mougin, *Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an*

- arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics*, Biochemistry 41:7325 (2002).
16. G.M.A. Beynum, *Immobilized biocatalyst*, Biotechnology letters 2:127 (1980).
17. C.F. Blanford y F.A. Armstrong, *The pyrolytic graphite surface as an enzyme substrate: microscopic and spectroscopic studies*, Journal of Solid State Electrochemistry 10:826 (2006).
18. C.F. Blanford, R.S. Heath, y F.A. Armstrong, *A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O₂ reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface*, Chemical Communications 1710 (2007).
19. R. Bourbonnais, D. Leech, y M.G. Paice, *Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds*, Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects 1379:381 (1998).
20. M.M. Bradford, *Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry 72:248 (1976).
21. P.A. Brooksby y A.J. Downard, *Electrochemical and atomic force microscopy study of carbon surface modification via diazonium reduction in aqueous and acetonitrile solutions*, Langmuir 20:5038 (2004).
22. R.A. Bullen, T.C. Arnot, J.B. Lakeman, y F.C. Walsh, *Biofuel cells and their development*, Biosensors & Bioelectronics 21:2015 (2006).
23. R. Cammack, V.M. Fernandez, y E.C. Hatchikian, *Nickel-iron hydrogenase*, Methods in Enzymology 243:43 (1994).
24. S. Campuzano, M. Pedrero, y J.A. Pingarron, *A peroxidase-tetrathiafulvalene biosensor based on self-assembled monolayer modified Au electrodes for the flow-injection determination of hydrogen peroxide*, Talanta 66:1310 (2005).
25. R.E. Childs y W.G. Bardsley, *Steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen*, Biochemical Journal 145:93 (1975).
26. A. Christenson, N. Dimcheva, E.E. Ferapontova, L. Gorton, T. Ruzgas, L. Stoica, S. Shleev, A.L. Yaropolov, D. Haltrich, R.N.F. Thorneley, y S.D. Aust, *Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes*, Electroanalysis 16:1074 (2004).
27. R.A. Copeland, "A practical introduction to structure, mechanism and data analysis", Wiley-VCH, USA (1996).
28. S.R. Couto y J.L.T. Herrera, *Industrial and biotechnological applications of laccases: A review*, Biotechnology Advances 24:500 (2006).

29. F. Davis y S.P.J. Higson, *Biofuel cells - Recent advances and applications*, Biosensors & Bioelectronics 22:1224 (2007).
30. A.L. De Lacey, J. Moiroux, y C. Bourdillon, *Simple formal kinetics for the reversible uptake of molecular hydrogen by [Ni-Fe] hydrogenase from Desulfovibrio gigas*, European Journal of Biochemistry 267:6560 (2000).
31. R.S. Deinhammer, M. Ho, J.W. Andereg, y M.D. Porter, *Electrochemical oxidation of amine-containing compounds - a route to the surface modification of glassy-carbon electrodes*, Langmuir 10:1306 (1994).
32. M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, y J.M. Saveant, *Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts*, Journal of the American Chemical Society 114:5883 (1992).
33. S. Dementin, V. Belle, P. Bertrand, B. Guigliarelli, G. Adryanczyk-Perrier, A.L. De Lacey, V.M. Fernandez, M. Rousset, y C. Leger, *Changing the ligation of the distal [4Fe4S] cluster in NiFe hydrogenase impairs inter- and intramolecular electron transfers*, Journal of the American Chemical Society 128:5209 (2006).
34. L. Deng, L. Shang, Y.Z. Wang, T. Wang, H.J. Chen, y S.J. Dong, *Multilayer structured carbon nanotubes/poly-L-lysine/laccase composite cathode for glucose/O₂ biofuel cell*, Electrochemistry Communications 10:1012 (2008).
35. L. Deng, F. Wang, H. Chen, L. Shang, L. Wang, T. Wang, y S. Dong, *A biofuel cell with enhanced performance by multilayer biocatalyst immobilized on highly ordered macroporous electrode*, Biosensors & Bioelectronics 24:329 (2008).
36. A.J. Downard, *Electrochemically assisted covalent modification of carbon electrodes*, Electroanalysis 12:1085 (2000).
37. N. Duran, M.A. Rosa, A. D'Annibale, y L. Gianfreda, *Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review*, Enzyme and Microbial Technology 31:907 (2002).
38. P. Durao, Z.J. Chen, C.S. Silva, C.M. Soares, M.M. Pereira, S. Todorovic, P. Hildebrandt, I. Bento, P.F. Lindley, y L.O. Martins, *Proximal mutations at the type I copper site of CotA laccase: spectroscopic, redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants*, Biochemical Journal 412:339 (2008).
39. F.J. Enguita, L.O. Martins, A.O. Henriques, y M.A. Carrondo, *Crystal structure of a bacterial endospore coat component - A laccase with enhanced thermostability properties*, Journal of Biological Chemistry 278:19416 (2003).
40. F.J. Enguita, D. Marcal, L.O. Martins, R. Grenha, A.O. Henriques, P.F. Lindley, y M.A. Carrondo, *Substrate and doxygen binding to the endospore coat laccase from Bacillus subtilis*, Journal of Biological Chemistry 279:23472 (2004).

41. W.E. Farneth, B.A. Diner, T.D. Gierke, y M.B. D'Amore, *Current densities from electrocatalytic oxygen reduction in laccase/ABTS solutions*, Journal of Electroanalytical Chemistry 581:190 (2005).
42. W. Gao, X.H. Xia, J.J. Xu, y H.Y. Chen, *Three-dimensionally ordered macroporous gold structure as an efficient matrix for solid-state electrochemiluminescence of Ru(bpy)(3)(2+)/TPA system with high sensitivity*, Journal of Physical Chemistry C 111:12213 (2007).
43. G. Gupta, V. Rajendran, y P. Atanassov, *Laccase biosensor on monolayer-modified gold electrode*, Electroanalysis 15, 1577-1583 (2003).
44. G. Gupta, V. Rajendran, y P. Atanassov, *Bioelectrocatalysis of oxygen reduction reaction by laccase on gold electrodes*, Electroanalysis 16, 1182-1185 (2004).
45. A. Heller, *Miniature biofuel cells*, Physical Chemistry Chemical Physics 6:209 (2004).
46. K.H. Hyung, K.Y. Jun, H.G. Hong, H.S. Kim, y W. Shin, *Immobilization of laccase onto the gold electrode using β -mercaptopropionate*, Bulletin of the Korean Chemical Society 18, 564-566 (1997).
47. P.S. Jensen, Q. Chi, F.B. Grummen, J.M. Abad, A. Horsewell, D.J. Schiffrin, y J. Ulstrup, *Gold nanoparticle assisted assembly of a heme protein for enhancement of long-range interfacial electron transfer*, Journal of Physical Chemistry C 111:6124 (2007).
48. D.L. Johnson, J.L. Thompson, S.M. Brinkmann, K.A. Schuller, y L.L. Martin, *Electrochemical characterization of purified Rhus vernicifera laccase: Voltammetric evidence for a sequential four-electron transfer*, Biochemistry 42:10229 (2003).
49. A.K. Jones, E. Sillery, S.P.J. Albracht, y F.A. Armstrong, *Direct comparison of the electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst*, Chemical Communications 866 (2002).
50. Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino, y K. Kano, *Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis*, Physical Chemistry Chemical Physics 9:1793 (2007).
51. J.K. Kariuki y M.T. McDermott, *Formation of multilayers on glassy carbon electrodes via the reduction of diazonium salts*, Langmuir 17:5947 (2001).
52. A.M. Klibanov, *Enzyme stabilization by immobilization*, Analytical Biochemistry 93:1 (1979).
53. M. Klis, E. Maicka, A. Michota, J. Bukowska, S. Sek, J. Rogalski, y R. Bilewicz, *Electroreduction of laccase covalently bound to organothiol monolayers on gold electrodes*, Electrochimica Acta 52:5591 (2007).

54. T. Larsson, A. Lindgren, T. Ruzgas, S.E. Lindquist, y L. Gorton, *Bioelectrochemical characterisation of cellobiose dehydrogenase modified graphite electrodes: ionic strength and pH dependences*, Journal of Electroanalytical Chemistry 482:1 (2000).
55. E. Laviron, *General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems*, Journal of Electroanalytical Chemistry 101:19 (1979).
56. S.K. Lee, S.D. George, W.E. Antholine, B. Hedman, K.O. Hodgson, y E.I. Solomon, *Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase*, Journal of the American Chemical Society 124:6180 (2002).
57. C. Leger, A.K. Jones, S.P.J. Albracht, y F.A. Armstrong, *Effect of a dispersion of interfacial electron transfer rates on steady state catalytic electron transport in [NiFe]-hydrogenase and other enzymes*, Journal of Physical Chemistry B 106:13058 (2002).
58. K.W. Leitner, B. Gollas, M. Winter, y J.O. Besenhard, *Combination of redox capacity and double layer capacitance in composite electrodes through immobilization of an organic redox couple on carbon black*, Electrochimica Acta 50:199 (2004).
59. A. Leonowicz, N.S. Cho, J. Luterek, A. Wilkolazka, M. Wojtas-Wasilewska, A. Matuszewska, M. Hofrichter, D. Wesenberg, y J. Rogalski, *Fungal laccase: properties and activity on lignin*, Journal of Basic Microbiology 41:185 (2001).
60. X.C. Li, H.J. Zhou, P. Yu, L. Su, T. Ohsaka, y L.Q. Mao, *A miniature glucose/O₂ biofuel cell with single-walled carbon nanotubes-modified carbon fiber microelectrodes as the substrate*, Electrochemistry Communications 10:851 (2008).
61. Y. Liu, L. Huang, y S. Dong, *Electrochemical catalysis and thermal stability characterization of laccase-carbon nanotubes-ionic liquid nanocomposite modified graphite electrode*, Biosensors & Bioelectronics 23, 35-41 (2007).
62. F. Lopez-Gallego, L. Betancor, C. Mateo, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. Dellamora-Ortiz, J.M. Guisan, y R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports*, Journal of Biotechnology 119:70 (2005).
63. J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, y G.M. Whitesides, *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*, Chemical Reviews 105:1103 (2005).
64. H. Maeda, Y. Yamauchi, M. Hosoe, T.X. Li, E. Yamaguchi, M. Kasamatsu, y H. Ohmori, *Direct covalent modification of glassy-carbon surfaces with 1-alkanols by electrochemical oxidation*, Chemical & Pharmaceutical Bulletin 42:1870 (1994).

65. C. Mateo, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente, y J.M. Guisan, *Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment*, Enzyme and Microbial Technology 26:509 (2000).
66. I. Matera, A. Gullotto, S. Tilli, M. Ferraroni, A. Scozzafava, y F. Briganti, *Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus Trametes trogii complexed with p-toluate*, Inorganica Chimica Acta 361:4129 (2008).
67. A.M. Mayer y R.C. Staples, *Laccase: new functions for an old enzyme*, Phytochemistry 60:551 (2002).
68. S. Mazur, T. Matusinovic, y K. Cammann, *Organic-reactions of oxide-free carbon surfaces, an electroactive derivative*, Journal of the American Chemical Society 99:3888 (1977).
69. M.J. Moehlenbrock y S.D. Minteer, *Extended lifetime biofuel cells*, Chemical Society Reviews 37:1188 (2008).
70. O.V. Morozova, G.P. Shumakovich, S.V. Shleev, y Y.I. Yaropolov, *Laccase-mediator systems and their applications: A review*, Applied Biochemistry and Microbiology 43:523 (2007).
71. V. Morozova, G.P. Shumakovich, M.A. Gorbacheva, S.V. Shleev, y A.I. Yaropolov, *"Blue" laccases*, Biochemistry-Moscow 72:1136 (2007).
72. A. Naki y S.D. Varfolomeev, *Mechanism of the inhibition of laccase activity from polyporus-versicolor by halide-ions*, Biochemistry-Moscow 46:1344 (1981).
73. A. Naqui y S.D. Varfolomeev, *Inhibition mechanism of Polyporus laccase by fluoride ion*, Febs Letters 113, 157-160 (1980).
74. H.M. Nassef, A.E. Radi, y C.K. O'Sullivan, *Electrocatalytic sensing of NADH on a glassy carbon electrode modified with electrografted o-aminophenol film*, Electrochemistry Communications 8:1719 (2006).
75. H.M. Nassef, A.E. Radi, y C.K. O'Sullivan, *Electrocatalytic oxidation of hydrazine at o-aminophenol grafted modified glassy carbon electrode: Reusable hydrazine amperometric sensor*, Journal of Electroanalytical Chemistry 592:139 (2006).
76. U. Oesch y J. Janata, *Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide-films .1. Formation and reduction behavior of anodic oxides on gold*, Electrochimica Acta 28:1237 (1983).
77. H.R. Pershad, J.L.C. Duff, H.A. Heering, E.C. Duin, S.P.J. Albracht, y F.A. Armstrong, *Catalytic electron transport in Chromatium vinosum [NiFe]-hydrogenase: Application of voltammetry in detecting redox-active centers and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to the reversible H^+/H_2 value*, Biochemistry 38:8992 (1999).

78. J. Pinson y F. Podvorica, *Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts*, Chemical Society Reviews 34:429 (2005).
79. K. Piontek, M. Antorini, y T. Choinowski, *Crystal structure of a laccase from the fungus Trametes versicolor at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers*, Journal of Biological Chemistry 277:37663 (2002).
80. M. Pita, S. Shleev, T. Ruzgas, V.M. Fernandez, A.I. Yaropolov, y L. Gorton, *Direct heterogeneous electron transfer reactions of fungal laccases at bare and thiol-modified gold electrodes*, Electrochemistry Communications 8:747 (2006).
81. H.J. Qiu, C.X. Xu, X.R. Huang, Y. Ding, Y.B. Qu, y P.J. Gao, *Adsorption of laccase on the surface of nanoporous gold and the direct electron transfer between them*, Journal of Physical Chemistry C 112:14781 (2008).
82. L. Quintanar, C. Stoj, A.B. Taylor, P.J. Hart, D.J. Kosman, y E.I. Solomon, *Shall we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner*, Accounts of Chemical Research 40:445 (2007).
83. A. Ramanavicius, A. Kausaite, y A. Ramanaviciene, *Biofuel cell based on direct bioelectrocatalysis*, Biosensors & Bioelectronics 20:1962 (2005).
84. O. Rudiger, J.M. Abad, E.C. Hatchikian, V.M. Fernandez, y A.L. De Lacey, *Oriented immobilization of Desulfovibrio gigas hydrogenase onto carbon electrodes by covalent bonds for nonmediated oxidation of H₂*, Journal of the American Chemical Society 127:16008 (2005).
85. L. Rulisek, E.I. Solomon, y U. Ryde, *A combined quantum and molecular mechanical study of the O-2 reductive cleavage in the catalytic cycle of multicopper oxidases*, Inorganic Chemistry 44:5612 (2005).
86. S. Shleev, A. Jarosz-Wilkolazka, A. Khalunina, O. Morozova, A. Yaropolov, T. Ruzgas, y L. Gorton, *Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes*. Bioelectrochemistry 67, 115-124. 2005.
87. S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A.I. Yaropolov, J.W. Whittaker, y L. Gorton, *Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes*. Biosensors & Bioelectronics 20, 2517-2554. 2005.
88. S. Shleev, A. Christenson, V. Serezhenkov, D. Burbaev, A. Yaropolov, L. Gorton, y T. Ruzgas, *Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native Trametes hirsuta laccase at gold electrode* 5, Biochemical Journal 385:745 (2005).
89. S. Shleev, M. Pita, A.I. Yaropolov, T. Ruzgas, y L. Gorton, *Direct heterogeneous electron transfer reactions of Trametes hirsuta Laccase at bare and thiol-modified gold electrodes*, Electroanalysis 18:1901 (2006).
90. S. Shleev, C.T. Reimann, V. Serezhenkov, D. Burbaev, A.I. Yaropolov, L. Gorton, y T. Ruzgas, *Autoreduction and aggregation of fungal laccase in*

- solution phase: possible correlation with a resting form of laccase*, Biochimie 88:1275 (2006).
91. S.V. Shleev, O. Morozova, O. Nikitina, E.S. Gorshina, T. Rusinova, V.A. Serezhnikov, D.S. Burbaev, I.G. Gazaryan, y A.I. Yaropolov, *Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes*, Biochimie 86:693 (2004).
 92. E.I. Solomon, P. Chen, M. Metz, S.K. Lee, y A.E. Palmer, *Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins*, Angewandte Chemie International Edition 40, 4571-4590. 2001.
 93. E.I. Solomon, U.M. Sundaram, y T.E. Machonkin, *Multicopper oxidases and oxygenases*, Chemical Reviews 96:2563 (1996).
 94. D.J. Spira-Solomon, M.D. Allendorf, y E.I. Solomon. *Low-temperature magnetic circular dichroism studies of native laccase: confirmation of a trinuclear copper active site*. Journal of the American Chemical Society 108, 5318-5328. 1986.
 95. J.V. Staros, R.W. Wright, y D.M. Swingle, *Enhancement by n-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions*, Analytical Biochemistry 156:220 (1986).
 96. E. Theodoridou, J.O. Besenhard, y H.P. Fritz, *Chemically modified carbon-fiber electrodes .2. characterization of trimethylsilanized carbon-fibers by reduction of adsorbed ortho-nitrophenol*, Journal of Electroanalytical Chemistry 124:87 (1981).
 97. M.H. Thuesen, O. Farver, B. Reinhammar, y J. Ulstrup, *Cyclic voltammetry and electrocatalysis of the blue copper oxidase Polyporus versicolor laccase*, Acta Chemica Scandinavica 52:555 (1998).
 98. C.F. Thurston, *The structure y function of fungal laccases*, Microbiology 140, 19-26. 1994.
 99. S. Tsujimura, Y. Kamitaka, y K. Kano, *Diffusion-controlled oxygen reduction on multi-copper oxiclase-adsorbed carbon aerogel electrodes without mediator*, Fuel Cells 7:463 (2007).
 100. K.A. Vincent, J.A. Cracknell, O. Lenz, I. Zebger, B. Friedrich, y F.A. Armstrong, *Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:16951 (2005).
 101. F. Xu, *Oxidation of phenols, anilines, and benzothiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition*, Biochemistry 35, 7608-7614. 1996.
 102. F. Xu, R.M. Berka, J.A. Wahleithner, B.A. Nelson, J.R. Shuster, S.H. Brown, A.E. Palmer, y E.I. Solomon. *Site-directed mutations in fungal laccase: effect*

- on redox potential, activity y pH profile*. Biochemical Journal 334, 63-70. 1998.
103. A.I. Yaropolov, O.V. Skorobogatko, S.S. Vartanov, y S.D. Varfolomeyev, *Laccase - properties, catalytic mechanism, and applicability*, Applied Biochemistry and Biotechnology 49:257 (1994).
 104. C. Yoon y H. Kim, *Electrochemical Studies of Immobilized Laccases on the Modified Gold Electrodes*, Journal of the Korean Electrochemical Society 26 (2005).
 105. W. Zheng, H.M. Zho, Y.F. Zheng, y N. Wang, *A comparative study on electrochemistry of laccase at two kinds of carbon nanotubes and its application for biofuel cell*, Chemical Physics Letters 457:381 (2008).
 106. H.X. Zhou y K.A. Dill, *Stabilization of proteins in confined spaces*, Biochemistry 40:11289 (2001).